



TUG

Technische Universität Graz
Erzherzog-Johann-Universität

Verwertung von Maisernterückständen über Hydrolyse der Cellulose und Hemicellulose

Diplomarbeit von
Barbara Petschacher

2001

Betreuer: aoUniv.Prof.Dipl-Ing.Dr.techn. Gerhart Braunegg

Institut für Biotechnologie
Petersgasse 12/I, 8010 Graz

Hier soll ein **Danke** stehen

an meine Familie, besonders meine Eltern, für die großartige
Unterstützung jeder Art während meines Studiums

an Selina, für ihre Freundschaft und unsere perfekte Zusammenarbeit
während dieser Arbeit genauso wie durchs ganze Studium

an Martin, der zu dieser Arbeit viel mehr als seinen Scanner beigetragen
hat

und natürlich an Prof. Braunegg und die anderen am Institut für die
freundliche Unterstützung und die nette Atmosphäre

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
2	Mais	6
2.1	Über die Pflanze	6
2.2	Bezeichnung der Pflanzenteile	7
2.3	Chemische Hauptbestandteile	7
2.3.1	Cellulose	8
2.3.2	Hemicellulose	9
2.3.3	Lignin	10
2.4	Die Zellwand	11
3	Vorbehandlung des Maisstrohs	14
3.1	Physikalische Vorbehandlung	16
3.1.1	Mechanische Vorbehandlungsmethoden	16
3.1.2	Thermische Vorbehandlung	20
3.1.3	Radioaktive Bestrahlung als Vorbehandlung	25
3.2	Chemische Vorbehandlung	26
3.2.1	Vorbehandlung mit Alkali	27
3.2.2	Vorbehandlung mit Säure	37
3.2.3	Vorbehandlung mit Gasen	43
3.2.4	Vorbehandlung mit Oxidationsmittel	44
3.2.5	Vorbehandlung mit Cellulose-Lösungsmittel und Quellmitteln	47
3.2.6	Vorbehandlung durch Extraktion	49
3.3	Biologische Vorbehandlung	53
3.3.1	Bidelignifikation	53

4	<i>Hydrolyse der Cellulose und Hemicellulose</i>	57
4.1	Hydrolyse mit Säure	57
4.1.1	Geschichtlicher Überblick	57
4.1.2	Theorie der Säurehydrolyse	58
4.1.3	Cellulosehydrolyse mit konzentrierten Säuren	59
4.1.4	Cellulosehydrolyse mit verdünnter Säure	61
4.1.5	Hemicellulosenhydrolyse mit verdünnter Säure	66
4.1.6	Reaktoren und Prozesse für die Hydrolyse mit verdünnter Säure von Cellulose und Hemicellulose	73
4.1.7	Toxizität des Hydrolysats	78
4.2	Enzymatische Hydrolyse	79
4.2.1	Vor- und Nachteile einer enzymatischen Hydrolyse	79
4.2.2	Systematisierung und Wirkungsweise der Cellulasen	80
4.2.3	Hemicellulasen	83
4.2.4	Einsatzmöglichkeiten der Enzyme in der Cellulosehydrolyse	84
4.2.5	Prozeßparameter der Cellulosehydrolyse	84
5	<i>Produkte</i>	100
5.1	Zucker	100
5.1.1	Glucose	100
5.1.2	Xylose	102
5.2	Folgeprodukte	103
5.2.1	Ethanol	105
5.2.2	Milchsäure	107
5.2.3	2,3-Butandiol	109
5.2.4	Xylit	111
5.3	Lignin	115
6	<i>Zusammenfassung</i>	116
6.1	Allgemeines	116
6.2	Vorbehandlung	117
6.2.1	physikalische Vorbehandlung	118
6.2.2	chemische Vorbehandlung	118
6.2.3	Biologische Vorbehandlung	119

6.3 Hydrolyse	120
6.3.1 Säurekatalyse	120
6.3.2 Enzymatische Hydrolyse	121
6.4 Produkte	121
6.5 Schlußfolgerung und Aussichten	124
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	125
<i>Literatur</i>	126

1 Einleitung

Mais bildet eine wesentliche Grundlage der Landwirtschaft in der Steiermark. Die Maiskörner werden hierbei hauptsächlich in der Schweinemast eingesetzt. Die restliche Maispflanze bleibt nach der Ernte meist ungenutzt auf den Feldern zurück. Mit 6.000-8.000 kg Maisstrohanfall pro Hektar und somit 500.000 t¹⁾ pro Jahr in der gesamten Steiermark bilden die zurückbleibenden Pflanzenteile ein bisher ungenutztes Potential an nachwachsendem Rohstoff.

Um Möglichkeiten für dessen Verwertung zu finden, wurde unter Förderung der Steirischen Landesregierung vom Kornberg Institut für nachhaltige Regionalentwicklung und angewandte Forschung in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biotechnologie der TU Graz, dem Institut für Organische Chemie der Karl Franzens Universität Graz und der Firma BDI Anlagenbau Ges.m.b.H. eine technologische Vorstudie zum Thema „Mais und Mehr“ erstellt.

Im Zuge dieser Studie wurde eine Suche nach bereits bekannten Nutzungsstrategien in der Literatur (Science Citation Index, Chemical Abstracts), dem Internet und am Patentamt durchgeführt. Aus den Ergebnissen dieser Suche entstanden diese Arbeit, die Möglichkeiten zur Zuckergewinnung durch enzymatische oder säurekatalysierte Hydrolyse der Polysaccharide im Maisstroh und Möglichkeiten zur Weiterverarbeitung derselben darlegt, und zwei weitere Diplomarbeiten.^{2,3)}

Abgesehen vom wirtschaftlichen Potential, das die Verwertung von Maisstroh für den ländlichen Raum der Steiermark darstellt, ist die Erforschung von Einsatzmöglichkeiten für nachwachsende Rohstoffe immer auch von globalem Interesse in Hinblick auf das Ziel einer nachhaltigen Wirtschaft mit möglichst geringer Eingriffstiefe in die Natur. Verwertung von CO₂-neutralen Rohstoffen wie Maisstroh muß in Zukunft eine wichtige Rolle spielen, wenn der Verbrauch an fossilen Rohstoffen und damit der Ausstoß an Treibhausgasen reduziert werden soll.

Einige grundlegende Aspekte sollten bei der Verwertung von Maisstroh beachtet werden:

- Für eine möglichst gewinnbringende Verwertung der Erntereste wird immer ein integriertes Konzept am sinnvollsten sein, das über verschiedene Verwertungsschienen alle Teile der Pflanze in möglichst hochwertige Produkte überführt. Oft wird es notwendig sein, höherwertige Teile, wie zum Beispiel den Kolben, getrennt zu Produkten zu verwerten, die eine größere Gewinnspanne versprechen. Es wird also kaum eine einzige Verwertungstechnologie die ökonomisch sinnvollste Lösung darstellen.
Eine getrennte Ernte des Kolbens ist mit den derzeit eingesetzten Maschinen mit geringen Umbauten leicht möglich. ⁴⁾
- Durch die Verwertung der Pflanzenreste wird ein enger ökologischer Kreislauf unterbrochen. Die Auswirkungen der Entfernung der Maisernterückstände von den Feldern muß daher berücksichtigt werden. Allerdings ist der Düngungseffekt durch Maisstroh mit 20-25 kg Stickstoff pro Hektar relativ gering. ¹⁾
- Maisstroh fällt mit der Ernte einmal im Jahr in großer Menge an. Eine sofortige Aufarbeitung desselben ist ökonomisch sinnlos, da die Verwertungsanlagen so das restliche Jahr unausgelastet wären. Daher muß die Biomasse während der kontinuierlichen Aufarbeitung bis zu einem Jahr gelagert werden. Dies führt zu einzurechnenden Kosten für Lagerplatz, Lagertechnologie, Stabilisatoren, etc.. Eine technische und wirtschaftliche Optimierung der Lagerung ist also Voraussetzung für eine sinnvolle Nutzung von Mais-Ernterückständen.
- Auch der Transport des Materials ist ein aufgrund der geringen Dichte sowohl ökonomisch als auch im Hinblick auf das Ziel der Nachhaltigkeit wichtiger Faktor. Für die gewinnbringende Verwertung von Maisstroh muß die Aufarbeitung dezentral erfolgen, was zu einer Beschränkung der Anlagengröße führt.

2 Mais

2.1 Über die Pflanze

Der Mais, lateinisch *Zea mays*, gehört zur Familie der *Poaceae* (= *Gramineae*), der „Echten Gräser“. ⁵⁾ Im Unterschied zu den anderen Getreidearten, die ebenfalls zu dieser Familie gehören, ist der Mais einhäusig getrenntgeschlechtig. Endständige männliche Blüten bilden terminale Rispen, während die weiblichen seitenständigen Blüten kolbenartig ausgebildet sind (siehe Abb. 1). In der Regel erfolgt die Bestäubung durch Wind. Die Maispflanze wird bis zu 2,5 Meter hoch. ⁶⁾



Abb. 1: Maissproß mit männlicher Blüte in terminaler Rispe und weiblicher Blüte in achselständigem Kolben ⁶⁾

Die wahrscheinlich erste in Europa angebaute Art (*Zea mays* subsp. *mays*) entstand in Mexiko aus annuellen Wildformen der Teosintenverwandtschaft (*Zea mays* subsp. *mexicana*) durch mutative Veränderungen und menschliche Selektion. Mais wurde seit dem 6. Jahrtausend v. Chr. von den Indianern kultiviert. ⁵⁾ Die Spanier übernahmen von den Bewohnern der karibischen Inseln den Namen „mahiz“ und brachten die Pflanze um 1500 nach Europa, wo sie allerdings erst im 17. Jahrhundert angebaut wurde. Seit dem zweiten Weltkrieg wird er zunehmend auf der ganzen Welt kultiviert, in den Industrieländern allerdings hauptsächlich als Futtermittel. ⁷⁾

2.2 Bezeichnung der Pflanzenteile

Kolben:

Da sich diese Arbeit ausschließlich auf eine Weiterverwendung der Pflanzenteile nach der Ernte der Maiskörner bezieht, ist unter „Kolben“ hier jeweils nur das Innere, die Spindel des Maiskolbens, ohne Körner zu verstehen.

Maisstroh, „Stover“:

Maisstroh wird die gesamte Restpflanze, also Blätter, Stengel, Spindel, Hüllblätter des Kolben usw., genannt. „Maisstroh“ ist das dem englischen Wort „Stover“ am ehesten entsprechende Wort. Im Englischen werden damit meist die Stengel und Blätter der Pflanze gemeinsam bezeichnet, manchmal allerdings zählen auch die Kolbenspindeln dazu. Aufgrund des Fehlens eines entsprechenden Wortes für Maisstroh ohne die Kolbenspindel im Deutschen, wurde das englische Wort „Stover“ in dieser Arbeit verwendet.

2.3 Chemische Hauptbestandteile

Die Maispflanze enthält chemisch gesehen, wie alles natürlich vorkommende lignocelluläre Material, die drei Hauptbestandteile Cellulose, Hemicellulose und Lignin. Der Kolben, womit in dieser Arbeit immer das Kolbeninnere ohne Maiskörner gemeint ist, enthält allgemein mehr Hemicellulose als der Stengel (siehe Tab. 1). Die Analysedaten über genaue Gehalte variieren in der Literatur etwas, was möglicherweise durch unterschiedliche Reifungszustände des untersuchten Materials und die verschiedenen Maissorten verursacht wird.

Tab. 1: Hauptbestandteile des Maisstrohs⁸⁾

	Cellulose [%]	Hemicellulose [%]	Lignin [%]
Kolben	45	35	15
Stengel	35	25	35

2.3.1 Cellulose

Cellulose ist die auf der Erde in größter Menge vorhandene organische Substanz.⁹⁾ Jährlich werden etwa 10^{12} Tonnen dieses Makromoleküls synthetisiert.⁵⁾

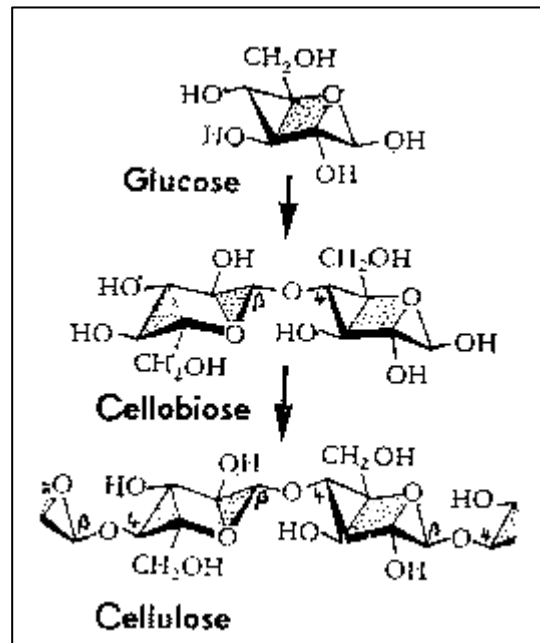


Abb. 2: Struktur von Glucose, Cellobiose und Cellulose⁷⁾

Cellulose ist ein aus Glucoseeinheiten aufgebautes Polysaccharid mit sehr hohen Polymerisationsgraden: 2.000 bis 15.000¹⁰⁾ β -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch verknüpfte Glucoseringe bilden lange, unverzweigte und geradegestreckte Kettenmoleküle. Zusätzlich bilden sich zwischen Hydroxylgruppen aufeinanderfolgender Ringe Wasserstoffbrückenbindungen aus.

Je zwei benachbarte Zuckermoleküle bilden die Grundwiederholungseinheit. Dieses aus zwei Ringen zusammengesetzte Molekül wird Cellobiose genannt (siehe Abb. 2). Der eine Zuckerring ist im Vergleich zum anderen entlang der Molekülachse um 180° gedreht. Bei der Verknüpfung der Cellobiosemoleküle zu langen Ketten, der Cellulose, kommen die Pyranosidringe der einzelnen Monomere durch diese Verknüpfung entlang der Glucankette ungefähr in einer Ebene zu liegen. Die bis zu über 8 μm langen Celluloseketten sind also bandförmig. Durch diese Form wird ein längsseitiges Aneinanderlagern der Ketten unter Bildung intermolekularer Wasserstoffbrücken stark begünstigt.⁷⁾

2.3.2 Hemicellulose

Hemicellulose ist die dritthäufigste organische Struktur auf der Erde und weist eine große Vielfalt an Strukturen und Zusammensetzungen auf. ¹¹⁾ Es handelt sich um lineare oder kurz verzweigte Heteropolymere aus Pentosen wie D-Xylose und L-Arabinose, Hexosen wie D-Glucose, D-Galactose und D-Mannose und Uronsäuren wie D-Glucuronsäure und D-Galacturonsäure (siehe Abb.3). Das Polymer kann außerdem methyliert oder acetyliert sein. Der Polymerisationsgrad liegt bei etwa 200, meist sind die Zucker β -(1→4)-glycosidisch verknüpft. ¹²⁾ Je nach den Monomeren in der Hauptkette unterscheidet man Xylane, Mannanane, Galactane und Arabinane. ¹³⁾ Xylane, besonders mit Arabinan in den Seitenketten, sind die häufigsten Hemicellulosen.

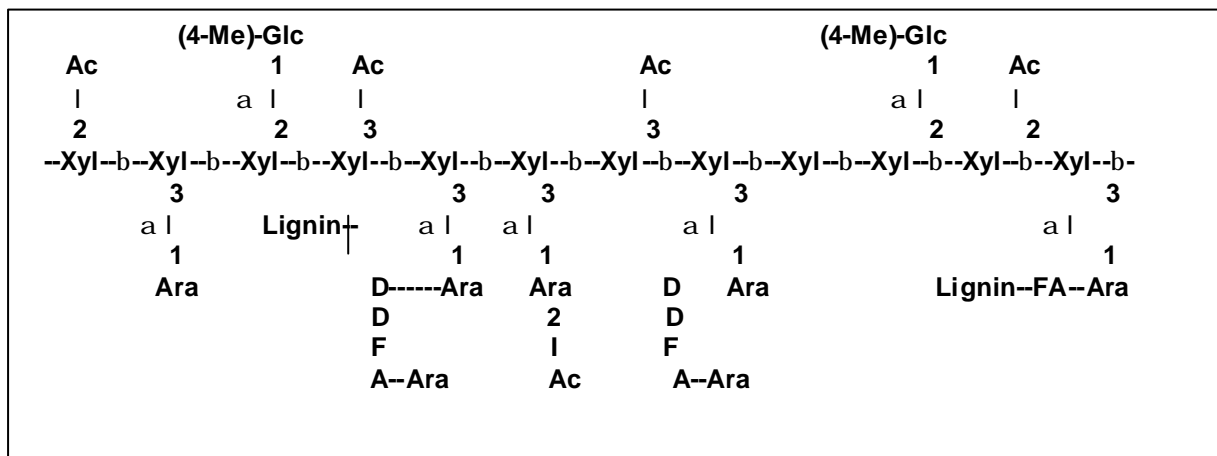


Abb. 3: Schematische Darstellung eines Xylans; Xyl: 1,4-D-Xylopyranose, Ara: L-Arabinofuranose, (4-Me)-GlcA: (4-O-methyl)-D-Glucopyranuronsäure, Ac: Acetyl, FA: Ferulasäure, DDFF: Dehydrodiferulasäure ¹⁴⁾

Es treten auch unverzweigte Homopolymere auf, zum Beispiel ein reines Xylan im Maiskolben (siehe Abb. 4). ⁹⁾

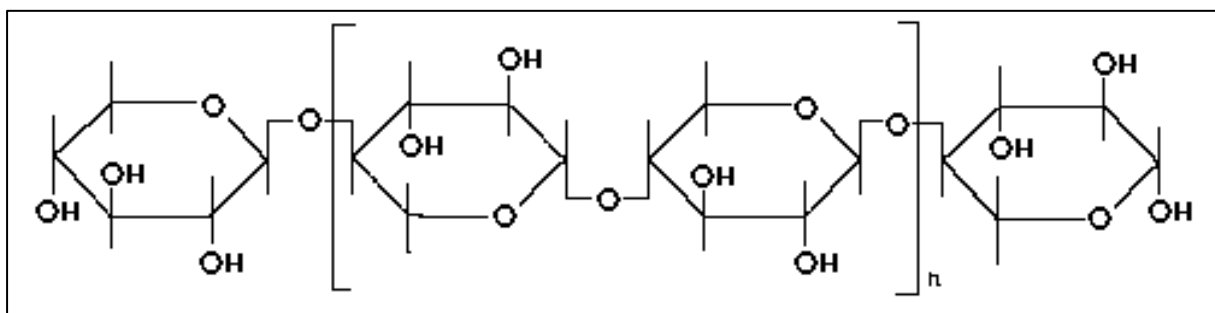


Abb. 4: Xylan aus Maiskolben ⁹⁾

2.3.3 Lignin

Das Lignin, das mengenmäßig nach Cellulose die wichtigste organische Substanz in der Natur darstellt (Jahresproduktion ca. $2 \cdot 10^{10}$ Tonnen, etwa 25 % der terrestrischen Biomasse), entsteht durch dehydrierende Polymerisation dreier Alkohole, des p-Cumarylalkohols, des Coniferylalkohols und des Sinapylalkohols.

Die Ligninbausteine werden über Radikalbildung in mannigfaltiger Weise zu Makromolekülen polymerisiert. „Lignin“ bezeichnet demnach keine strukturell streng definierte Verbindung. Abbildung 5 zeigt einen Ausschnitt aus einem möglichen Ligninriesenmolekül.⁵⁾

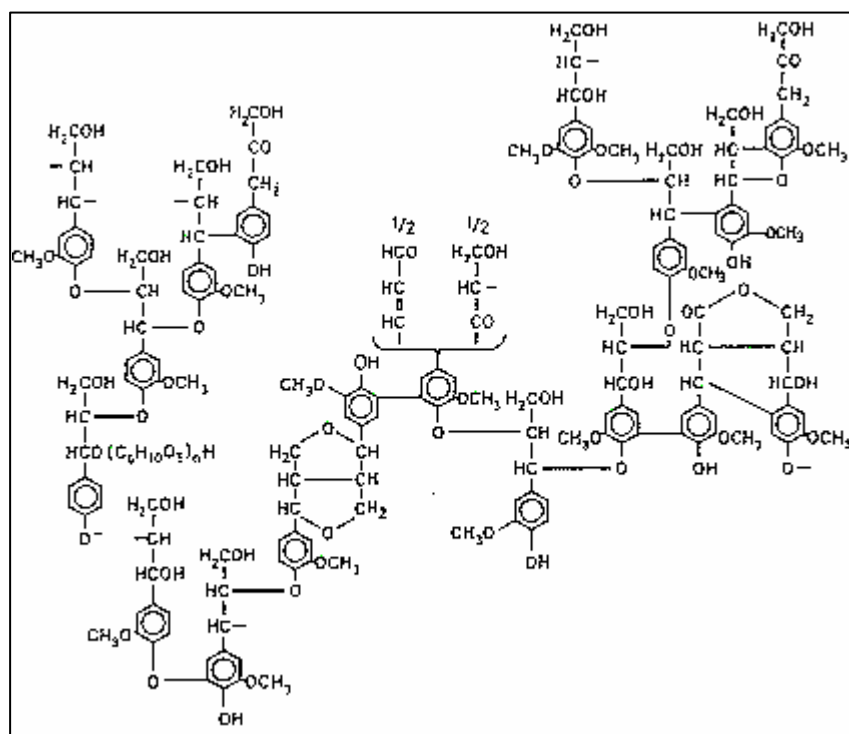


Abb. 5: Formelausschnitt aus Fichtenlignin⁵⁾

2.4 Die Zellwand

Im Gegensatz zu tierischen Zellen weisen pflanzliche Zellen eine Zellwand auf. Sie besitzt Schutz- und Festigungsfunktionen. Die Zellwand zwischen zwei pflanzlichen Zellen ist aus einer vorerst mit der Zellwandmatrix (Protopectine und Pectine) gefüllten Mittellamelle, der beidseitig anschließenden Primärwand und der darauf folgenden Sekundärwand aufgebaut (siehe Abb. 6).

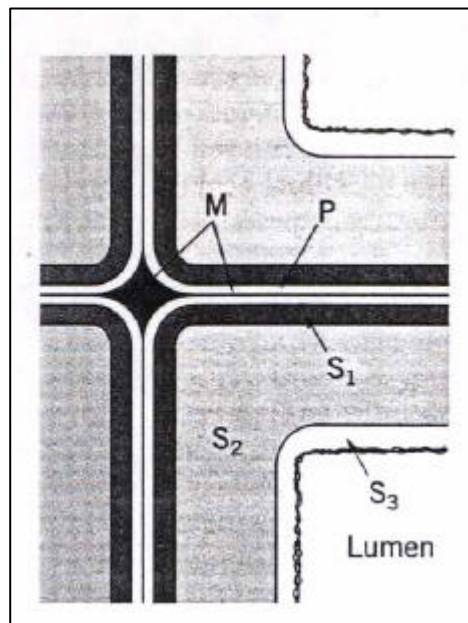


Abb. 6: Schematischer Aufbau der pflanzlichen Zellwand, M: Mittellamelle, P: Primärwand, S: Sekundärwand (in drei Schichten S1,S2,S3) ¹⁵⁾

Die Primärwand besteht aus Pectin, Hemicellulose und nur wenig Cellulose. An dieser wird die Sekundärwand ausgebildet, die durch einen hohen Anteil an Cellulose sehr stabil ist. ⁷⁾

Durch Aneinanderlagerung von Celluloseketten entstehen zunächst Elementarfibrillen mit einem Durchmesser von 3 nm und schließlich auch wesentlich dickere Mikrofibrillen mit 5 – 30 nm Durchmesser (siehe Abb.7, Seite 12). In solchen Gerüstfibrillen bestehen über weite Strecken kristallgitterartige Ordnungen. Dazwischen liegen weniger hochgeordnete eher amorphe Bereiche.

Gerüstfibrillen sind durch die großteils kristalline Struktur sehr reißfest. Ein 1 mm dicker, kompakter Cellulosefaden könnte ein Gewicht von über 60 kg tragen, das entspricht 80 % der Reißfestigkeit von Stahl. ⁵⁾

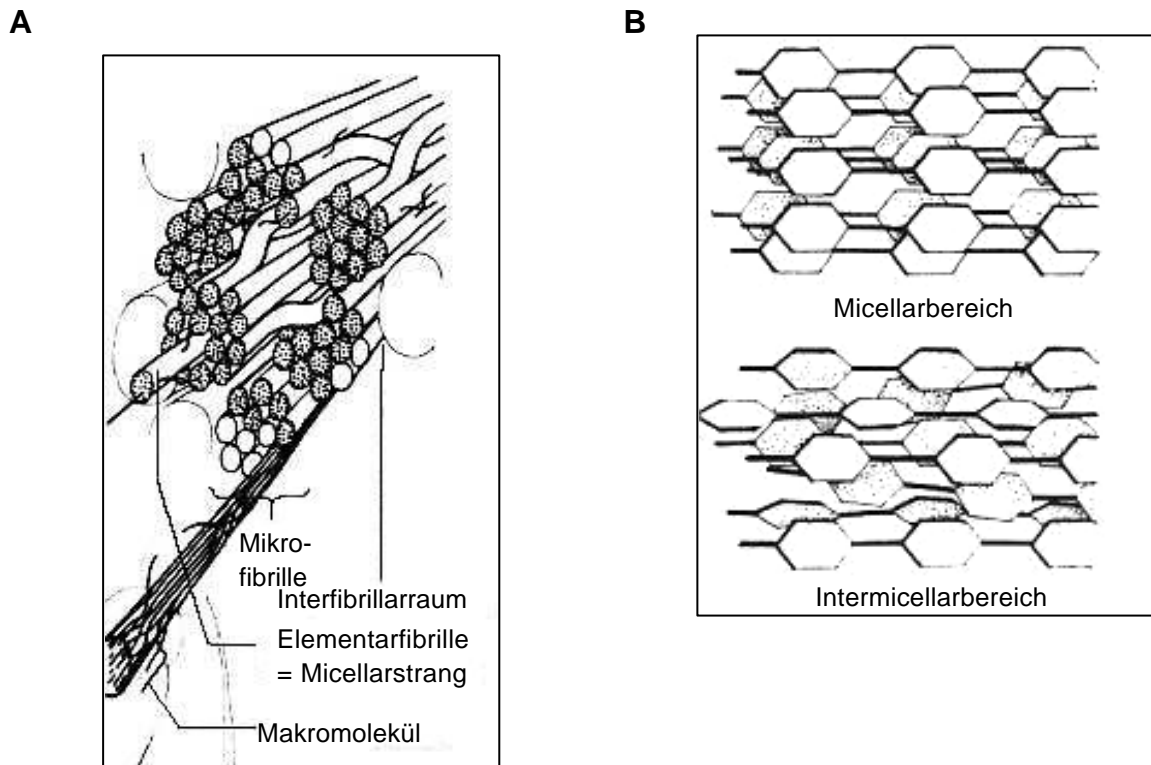


Abb. 7: A: Aus Elementarfibrillen bestehendes Mikrofibrillenbündel in der Zellwand, B: kristalline und eher amorphe Bereiche der Cellulosefibrillen.⁷⁾

An die Cellulosemikrofibrillen in der Zellwand lagern sich Hemicelluloseketten mantelförmig an (siehe Abb.8). Die Bindung erfolgt nicht-kovalent über Wasserstoffbrückenbindungen der Zucker der Hemicellulosenhauptkette zur Cellulose.¹⁶⁾

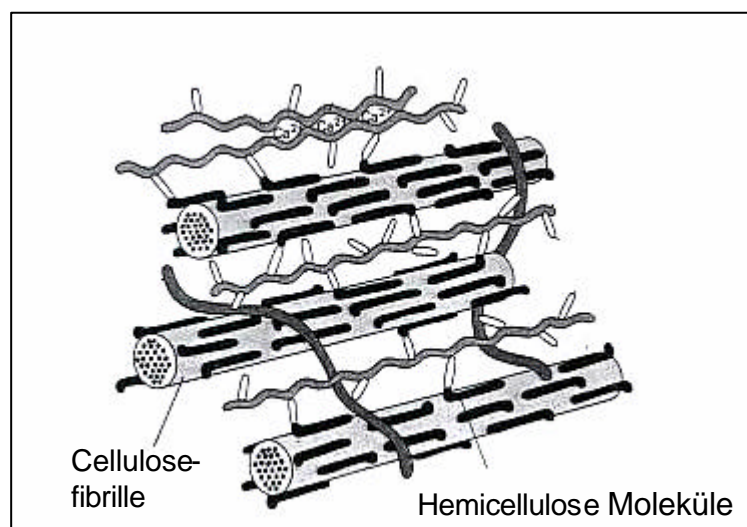


Abb. 8: Verknüpfung von Cellulosemikrofibrillen mit Hemicellulose in der Zellwand.¹⁶⁾

In druckfesten Zellwänden sind die Gerüstfibrillen in formfeste Materialien eingepackt, „inkrustiert“. Als Inkrusten treten neben Mineralsubstanzen vor allem Lignine auf. Inkrustation mit Lignin bedeutet die Verholzung einer Zellwand. Lignin entsteht in der verholzenden Zellwand durch Polymerisation von Phenolkörpern. Die nach allen Raumrichtungen wachsenden Riesenmoleküle von Lignin durchwuchern das Mikrofibrillengerüst der Zellwände und füllen den Interfibrillarraum (siehe auch Abb.6, Seite 11). Da Lignin-Makromoleküle miteinander sekundär zu größeren Einheiten verwachsen und sich über die Mittellamelle ausbreiten können, entspricht die Ligninmasse einer verholzten Pflanze schlußendlich einem einzigen Riesenmolekül. Dieses wird auch kovalent mit den polymeren Kohlenhydraten der Zellwand verknüpft. Die Zellwandmatrix wird bei der Lignifizierung verdrängt.⁵⁾

Verholzte Zellwände bestehen im typischen Fall zu etwa $\frac{2}{3}$ aus Cellulose und Hemicellulose und zu $\frac{1}{3}$ aus Lignin. Die Auftrennung lignocellulären Materials in seine Hauptbestandteile stellt angesichts der engen Verknüpfung derselben eine anspruchsvolle Aufgabe dar.

3 Vorbehandlung des Maisstrohs

Ein Möglichkeit, Mais-Ernterückstände einer weiteren Verwendung zuzuführen, ist die Auftrennung dieses lignocellulären Materials in seine Hauptbestandteile und deren getrennte Verwertung.

Cellulose und Hemicellulose können in ihre monomeren Zucker gespalten, also einer Hydrolyse unterzogen werden. Man erhält als Hauptprodukte Glucose und Xylose, die dann weiter fermentativ oder chemisch umgesetzt werden können.

Zur Gewinnung der Zucker stehen prinzipiell zwei Methoden der Hydrolyse zur Verfügung, die enzymatische Aufspaltung und die säurekatalysierte Verzuckerung (siehe Kapitel 4).

Bevor das Maisstroh verzuckert werden kann, ist aber in jedem Fall eine gewisse Vorbehandlung nötig. Ein entsprechendes Verfahren ist besonders wichtig, wenn das Material enzymatisch hydrolysiert werden soll. Wie bereits beschrieben (Kapitel 2.3), liegen die drei Hauptbestandteile in lignocellulärer Biomasse in komplex verbundener Struktur vor. Dadurch wird die enzymatisch Hydrolyse stark erschwert.

Lignocellulose ist sehr resistent gegen den Angriff von Enzymen. Damit es zur Hydrolyse kommen kann, muß das Enzym an die Oberfläche des Cellulosemoleküls binden. Cellulasen haben ein Molekulargewicht von 30 – 60 kDa und eine ellipsoide Form. Ihre geringsten und größten Durchmesser liegen zwischen 30 und 200 Angström. Durch die hohe Kristallinität der Cellulose sind aber die Poren zwischen den Cellulosefasern sehr klein, sodaß dem Enzym ein Großteil nicht zugänglich ist.⁸⁾

Auch die Lignin- und Hemicelluloseanteile tragen zu einer Verminderung der Hydrolysierbarkeit von unbehandeltem Material bei. Das Lignin, das die Cellulosefasern inkrustiert (siehe auch Kap. 2.3), verringert die verfügbare Oberfläche weiter. Außerdem kann Lignin, obwohl es für die Hydrolyse mit Cellulase unzugänglich ist, einen Teil der aktiven Cellulase adsorbieren und so von der Interaktion mit Cellulose fernhalten.

Hemicellulosen bilden eine Art Schutzschild um die Cellulose, das vom Enzym nur schwer durchdrungen werden kann. Auch extrahierbare Stoffe (z.B. Harze, Wachse) beeinflussen die Hydrolyse, weil sie hydrophob sind.¹⁷⁾

Alles in allem sind nur etwa 20 % des Porenvolumens für das Enzym zugänglich⁸⁾. Die Hydrolyse unbehandelten Materials wird dadurch langsam und unvollständig.

Aus diesen Gründen ist für die enzymatisch Hydrolyse von lignocellulärer Biomasse eine geeignete Vorbehandlung unumgänglich, durch die die komplexe Struktur

aufgeschlossen und für das Enzym zugänglich gemacht wird. Dies wird durch folgende Vorgänge erreicht:

- Erhöhung der spezifischen Oberfläche durch Verringerung der Partikelgröße und der Kristallinität der Cellulose
- Lösung des Hemicelluloseanteils
- Zerstörung des Cellulose – Lignin – Komplexes und Entfernung des Lignins

Die Anforderungen an geeignete Vorbehandlungsmethoden sind daher folgende ¹⁷⁾:

- Die Hydrolysierbarkeit von Cellulose durch Cellulase soll gesteigert werden, um möglichst hohe Ausbeuten an Glucose für Fermentationen zu erhalten.
- Jede der einzelnen Fraktionen des lignocellulären Materials sollte in möglichst großer Reinheit erhalten werden.
- Die Produktion von Hexosen und Pentosen für die biotechnologische Herstellung von Kraftstoffen und Chemikalien muß möglichst preisgünstig sein.
- Die Ligninkomponenten sollten in andere Chemikalien umwandelbar sein.

Auch für andere, in dieser Arbeit nicht behandelte Bereiche ist eine entsprechende Vorbehandlung notwendig:

- Zur Verwendung von billiger lignocellulärer Biomasse zur Erzeugung von proteinreichem Tierfutter.
- Zur Verbesserung von Zellstoff- und Bleichprozessen in der Papierindustrie.

Die Möglichkeiten zur Vorbehandlung lignocellulären Materials sind vielfältig, wobei die meisten vor einer enzymatischer Hydrolyse benötigt werden. Für eine Säurehydrolyse reicht schon eine entsprechende Zerkleinerung des Materials aus, meist werden aber auch hier einige Arbeitsschritte vorgeschaltet, um die Ausbeute zu erhöhen.

Grob teilt man die Vorbehandlungsmethoden in physikalische, chemische und biologische Methoden ein.

3.1 Physikalische Vorbehandlung

Die physikalischen Vorbehandlungsmethoden können in zwei Kategorien eingeteilt werden, in mechanische und nicht-mechanische. Zu den nicht-mechanischen Vorbehandlungsmethoden zählen thermische Methoden und die Bestrahlung des Ausgangsmaterials mit Gammastrahlung.

3.1.1 Mechanische Vorbehandlungsmethoden

Die physikalischen Kräfte während einer mechanischen Vorbehandlung spalten die Biomasse in feine Partikel, die ein großes Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis aufweisen und damit für enzymatische und Säurehydrolyse gut geeignet sind. Außerdem kommt es beim Mahlen auch zu einer Verringerung der Cellulosekristallinität.¹⁸⁾

Zusätzlich erlaubt eine feinere Aufmahlung eine höhere Konzentration an Material im Prozeßstrom und verringert dadurch das benötigte Reaktorvolumen. Auch eine gute Verteilung der Reagenzien kann so besser gewährleistet werden.¹⁷⁾

Zur Aufmahlung von lignocellulärem Material kommen verschiedene Mühlenarten zum Einsatz:

Kugelmühlen:

Das Mahlgut wird gemeinsam mit den Mahlkugeln in einer Trommel gedreht und durch das Aufeinanderschlagen der Kugeln gemahlen.¹⁸⁾

Mahlung mit einer Kugelmühle ist eine effektive Mahlmethode zur Verbesserung der enzymatischen Hydrolyse. Neben der Partikelverkleinerung wird die kristalline Struktur zerstört und die chemischen Bindungen langer Kettenmoleküle gebrochen. Die Effektivität der Behandlung hängt auch vom Material ab. Eine weitere Verbesserung des Resultats bringt die Verwendung von vibrierenden Kugelmühlen, die vibrieren statt sich zu drehen.

Fan et al.¹⁹⁾ untersuchten die Auswirkung von Mahlen mit einer Kugelmühle auf Solca Flocc, ein Cellulosesubstrat. Sie fanden starke Abnahme des Kristallinitätsindex aber nicht die erwartete Zunahme der spezifischen Oberfläche mit zunehmender Mahlzeit. Die Hydrolyserate stieg (siehe Tab. 2, Seite 17).

Tab. 2: Strukturelle Parameter und Ausmaß der Hydrolyse^{a)} von Cellulose (Solca Floc) nach Mahlung in einer Kugelmühle¹⁸⁾

Mahlzeit	Spezifisch Oberfläche [m²/g]	Kristallinitätsindex [CrI]	Hydrolyseergebniss nach 8 h [g/L]
0	2,13	74,2	14,5
12	2,09	66,3	16,8
24	2,26	30,8	18,8
48	2,36	18,7	23,3
96	1,91	4,9	/

^a Hydrolysebedingungen: 5 % w/v Substratsuspension bei 50 °C und pH 4,8

Trotz der guten Ergebnisse wird die Mahlung mit einer Kugelmühle durch die lange Behandlungszeit und die Prozeßkosten im großen Maßstab kaum anwendbar sein.

Walzenmühlen:

Walzenmühlen bestehen aus zwei Walzen deren Abstand voneinander eingestellt werden kann. Das lignocelluläre Material wird zwischen den Walzen durchgepreßt und gewalzt.¹⁸⁾

Diese Mühlen brauchen weniger Energie als Kugelmühlen, reduzieren aber ebenfalls den Kristallinitätsindex, vergrößern die spezifische Oberflächen und verringern insbesondere den Polymerisationsgrad¹⁷⁾. Eine Verbesserung in der Enzymzugänglichkeit wird hauptsächlich durch geringeren Abstand zwischen den Walzen und längere Bearbeitungszeit bewirkt.

Hammermühlen:

Hammermühlen bestehen aus einem Rotor, an den ein Satz Hämmer angebracht ist. Durch die Drehung schlagen die Hämmer auf das Material auf einer Platte. Dies ergibt eine gute Zerkleinerung, der erreichbare Hydrolysegrad des Materials wird aber kaum erhöht.

Kolloidmühlen:

Kolloidmühlen bestehen aus zwei Scheiben die gegeneinander rotieren. Das aufgeschlämmte Substrat wird zwischen ihnen gemahlen. Es werden zwar geringe Verbesserungen der Hydrolysierbarkeit erreicht, die hohen Betriebskosten machen einen Einsatz im größeren Maßstab aber nicht sinnvoll.¹⁸⁾

Messermühlen:

Mit Hilfe von Messermühlen kann besonders fasriges Material wie Lignocellulose gut zerkleinert werden.²⁰⁾

Besonders häufig wird zur Zerkleinerung von Maisstroh eine Wiley-Mühle verwendet (siehe Abb. 9). Bei diesem Messermühlentyp bewegen sich an einem Rotor angebrachte Klingen gegen stationäre Klingen in der Rotorummantelung.²¹⁾

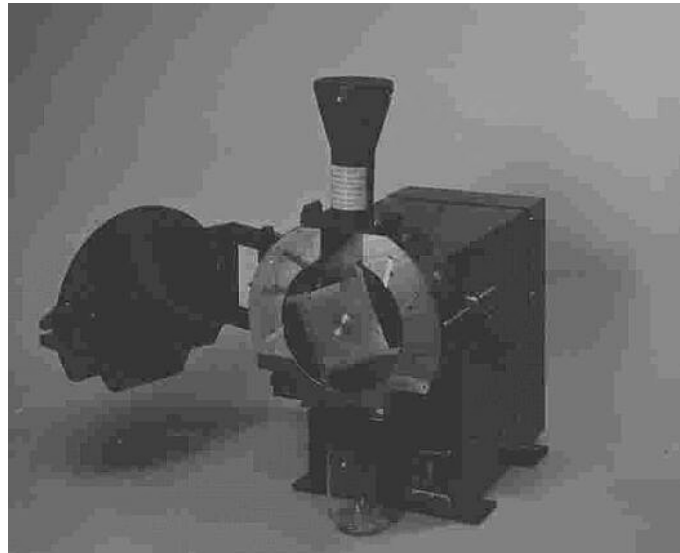


Abb. 9: Wiley Mühle

Anwendung der Mahlung als Vorbehandlung von Maisstroh:

Maiskolben und –stover werden vor der Verarbeitung meist gemahlen und gesiebt. Häufig werden Partikel mit Durchmesser vom ca. 2 mm (~ 8 mesh) eingesetzt^{22, 23, 24, 25, 26)}, aber auch kleinere Teilchen von unter 0,2-0,8 mm²⁷⁾ und gehackte Stücke bis 2 cm Länge wurden verwendet.

Elshafei et al.²⁸⁾ stellten fest, daß bei unbehandeltem Maisstover der Partikelgrößen 0,08 mm bis 2 mm (zerkleinert mit einer Messermühle) die enzymatische Hydrolyseraten nahezu ohne Einfluß der Teilchengröße zwischen 20-30 % für Hemicellulose und 35-45 % für Cellulose liegen. Anscheinend weist Maisstroh durch seine poröse Struktur bereits eine durch feinere Mahlung (zumindest mit dieser Mühle) kaum vergrößerbare verfügbare Oberfläche auf.

Auch Kaar et al.²⁹⁾ bemerkten, daß die Partikelgröße von gemahlenem Maisstroh keinen Einfluß auf die Zuckerausbeute hat (siehe Tab. 3, Seite 19), keine Angabe über die Arte der Mühle). Aufgrund dieser Ergebnisse scheint das Mahlen auf Teilchengrößen unter 0,85 mm (das entspricht 20 mesh) in industriellen

Anwendungen nicht notwendig, eventuell können sogar wesentlich größere Stücke eingesetzt werden.

Tab.3: Zuckerausbeuten bei verschiedenen Teilchengrößen von Maisstroh²⁹⁾

Partikelgröße		Zuckerausbeute
[mesh]	[mm]	[mg Glucoseäquivalent / g trockene Boimasse]
+ 20	> 0,85	433 +/- 14,9
- 20 + 40	0,425 – 0,85	433 +/- 11,4
- 40 + 80	0,18 – 0,425	432 +/- 14,5
- 80	< 0,18	395 +/- 4,9 ^a

^a Die etwas geringern Werte für – 80 mesh sind wahrscheinlich auf den höheren Verschmutzungsgrad in dieser Fraktion zurückzuführen.

Die Kosten, die durch die Mahlung der Biomasse entstehen, sind nicht zu vernachlässigen. Wilke et al.³⁰⁾ schätzten, daß etwa 7% der Kosten der Glucosegewinnung aus Maisstroh durch enzymatische Hydrolyse nach Vorbehandlung mit verdünnter Säure bei der Mahlung auf Teilchen kleiner als 2 mm entstehen.

Mahlung bringt also anscheinend besonders mit Kugelmühlen Verbesserungen in der Hydrolysierbarkeit, diese Methode ist aber aus wirtschaftlichen Gründen nicht als alleinige Vorbehandlung einsetzbar.¹⁷⁾ Der Effekt anderer Mühlen auf die Hydrolyserate scheint eher gering zu sein. Natürlich muß aber das verwendete Material zur weiteren Verarbeitung zerkleinert werden, wofür für Maisstroh häufig Wiley-Mühlen verwendet werden.

3.1.2 Thermische Vorbehandlung

Die polymeren Strukturen in lignocellulärem Material können zerstört werden, wenn man es hohen Temperaturen aussetzt. Die Temperaturen für diese Zersetzung sind für die drei Hauptkomponenten unterschiedlich. Hemicellulosen zersetzen sich ab 200 °C ²⁵⁾, ab ca. 300 °C ¹⁸⁾ wird auch Cellulose zerstört. Erst über 360 °C kommt es zur Spaltung des Lignins. ²⁵⁾ Durch diese Staffelung der Zersetzungstemperaturen ist durch thermische Vorbehandlung bereits eine Auftrennung des Materials in zumindest zwei Fraktionen möglich (siehe Abb. 10)

Die thermische Behandlung wird vorwiegend als Methode zur Abtrennung des Hemicelluloseanteils angewandt. Einerseits erhält man dadurch nach Extraktion mit Wasser eine eigene Fraktion vorwiegend aus Pentosen oder deren Oligosacchariden, die dann leicht in die monomeren Fünferzucker und deren Folgeprodukte umgesetzt werden können. Andererseits wird die Hydrolysierbarkeit des verbleibenden lignocellulären Rückstandes durch die Entfernung des Hemicelluloseschutzschildes wesentlich erhöht.

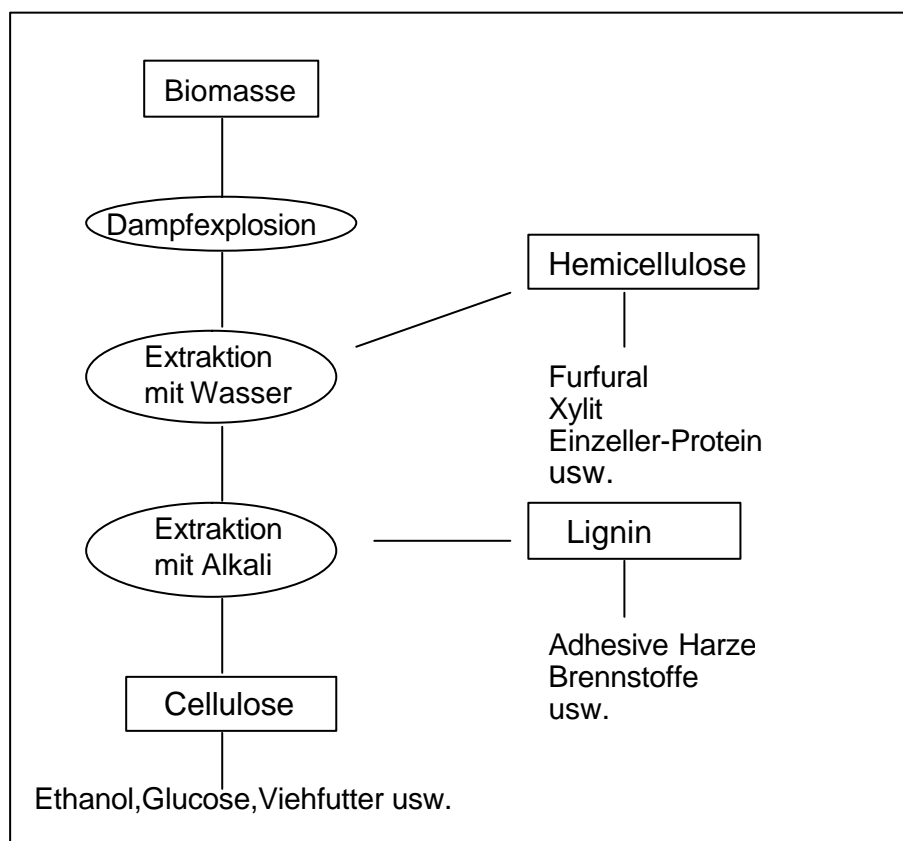


Abb. 10: Dampfexplosion (steam explosion), eine Art der thermischen Behandlung, gekoppelt mit Extraktion liefert Zwischenprodukte, die als Grundstoffe für verschiedenste Endprodukte Verwendung finden können. ³¹⁾

3.1.2.1.1 Autohydrolyse

Aufgrund der heterogenen Struktur und dem geringen Polymerisationsgrad der Hemicellulose ist diese viel leichter hydrolysierbar als die kristalline Cellulose. Behandlung allein mit Dampf, ohne Katalyse durch Säurezusatz, ist bereits ausreichend, um Zucker aus der Hemicellulose freizusetzen („Autohydrolyse“). Wie bereits erwähnt, haben viele Zuckerketten in den Hemicellulosen acetylierte Seitenketten. Die Autohydrolyse wird dadurch unterstützt, daß durch Abspaltung dieser Seitenketten Essigsäure gebildet wird. Das entstehende schwachsaure Milieu katalysiert die Hydrolyse.¹²⁾

3.1.2.1.2 Dampfexplosion (Steam Explosion)

Ein technischer Prozeß, bei dem die Autohydrolyse mittels heißem Dampf angewandt wird, wird Dampfexplosion genannt. (Allerdings findet man in der Literatur auch die Unterscheidung zwischen Autohydrolyse und Dampfexplosion je nach Temperatur zwischen 170 °C und 200 °C oder über 250 °C¹⁷⁾.)

Das Prinzip der Dampfexplosion besteht darin, die Biomasse mittels Dampf unter Druck auf die gewünschte Temperatur zu bringen. Die Reaktionszeit darf nicht zu lange sein, da es sonst zur Zersetzung der Zucker kommen kann. Um das Ende der Reaktion herbeizuführen, wird die Biomassesuspension zum gewünschten Zeitpunkt über ein Ventil explosionsartig auf Umgebungsdruck entspannt. Dadurch kommt es zur raschen Abkühlung unter 100 °C und zum Ende der Hydrolysereaktion.

Sowohl diskontinuierliche als auch kontinuierliche Dampfexplosions-Systeme wurden entwickelt¹⁷⁾, zwei Beispiele sollen hier kurz beschrieben werden:

Der Iotech Prozeß ist ein Beispiel für einen diskontinuierlichen Dampfexplosionsprozeß:

In diesem Prozeß wird die Biomasse in einen druckfesten Reaktor geladen. Dann wird Dampf zugeführt, bis die gewünschte Temperatur erreicht ist (240-250 °C). Nach der gewünschten Reaktionszeit (ca. 5 s) wird der Druck schnell reduziert, indem der Inhalt in einen Zyklon entspannt wird.⁸⁾

Der Batch-Prozeß hat aber deutliche Nachteile gegenüber einem kontinuierlichen Prozeß. Ein großes Problem ist, daß durch Wärmetransportlimitierung die gewünschten Produkte nur in relativ geringen Ausbeuten erhalten werden, weil ein Teil des Materials zu wenig, ein anderer zu stark erhitzt wird. Nur bei kontinuierlichen

Prozessen können die Bedingungen so genau kontrolliert werden, daß maximale Ausbeuten erzielt werden.^{17,31)}

Ein Beispiel für einen kontinuierlichen Dampfexplosionsprozeß ist das StakeTech System:

Das System besteht aus drei Hauptkomponenten, der Probeneinbringung, einem kontinuierlich geführten Reaktor und dem Entspannungsmechanismus (siehe Abb. 11)

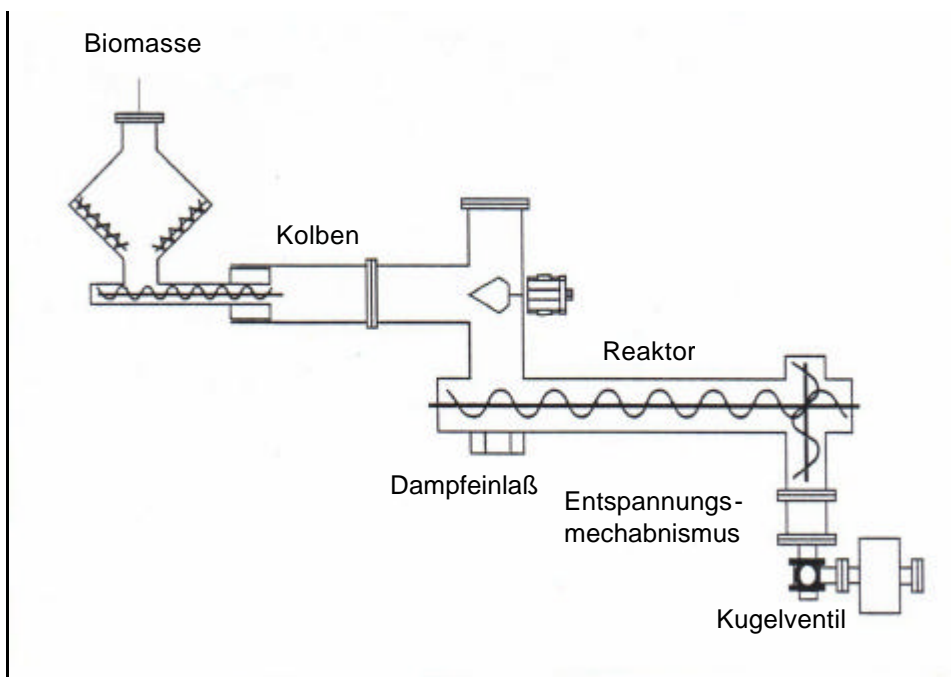


Abb. 11: Das StakeTech System³¹⁾

Das Beschickungssystem besteht aus einem hohlen, sich hin und her bewegenden Kolben, der die Biomasse an seinem Ende verdichtet. In diesem befindet sich eine Schnecke, die das Substrat vom Vorratsgefäß zum Ende des Kolbens transportiert. Erreicht die Biomasse eine gewisse Dichte, wird sie in den Reaktor entlassen und erhält beim Fall ihre ursprüngliche Dichte zurück. Diese Einbringungstechnik kann bei dreimal höherem Druck (bei 31 bar statt 10 bar) betrieben werden als eine herkömmliche Beschickung über eine Schnecke, bevor der Energieaufwand exponentiell zu steigen beginnt.

Der Reaktor besteht aus einem liegendem zylindrischen 316 L-Gefäß, das eine Schnecke enthält. Diese transportiert das Material vom Einlaß zum Auslaß. Typische Aufenthaltszeiten liegen dabei zwischen einer und vier Minuten. Der Reaktor wird

durch Dampf, der am Anfang durch ein Ansaugrohr eingebracht wird, unter Druck gesetzt. Der Arbeitsdruck liegt normalerweise zwischen 21 und 24 bar.

Am Ende des Aufschlussapparates wird das Material vor einem Kugelventil verdichtet. Das Ventil öffnet sich ca. alle 5 Sekunden für weniger als eine Sekunde. Bei Passierung des Ventils verdampfen Teile der überhitzten Flüssigkeit explosionsartig.

Die Energieeffizienz des StakeTech Systems liegt bei über 95 %. Ein Rohmaterial mit 50 % Wassergehalt wird in ein Produkt mit 54 % Wassergehalt umgewandelt.³¹⁾

3.1.2.1.3 Hydrothermolyse

Bei der Hydrothermolyse wird das Rohmaterial ebenfalls hohen Temperaturen bei hohem Druck ausgesetzt und so zersetzt, im Prozeßablauf tritt aber kein Dampf auf.¹⁷⁾

Rubio et al.²⁵⁾ beschreiben eine Art Kombination aus Hydrothermolyse und Explosion zur Behandlung von Maisstengel.

Die Stengel wurden auf 0,32-1mm gemahlen und mit einer Ethanol-Benzen Mischung (Volumsverhältnis 1:2) extrahiert. Reste der Lösungsmittel werden anschließend mit kochendem Wasser beseitigt. Durch diese Vorbehandlung werden extrahierbare Stoffe und ein Teil des Lignins entfernt und so die Hydrolyserate für die Hemicellulose verbessert.

Die Autohydrolyse wird in einer Kaskade von vier Autoklaven aus rostfreiem Stahl, die über Druckventile miteinander verbunden sind durchgeführt. Der letzte dient zur Kühlung. Die zwei mittleren (zum Start der Reaktion und zur plötzlichen Entspannung) können beheizt und gerührt werden. Weiters sind Vorrichtungen zur Spülung mit Stickstoff und zur Druckerhöhung vorhanden.

Eine wässrige 4 % ige Suspension des vorbehandelten Materials wird nach 30 minütiger Vorbehandlung in Autoklav 3 übergeleitet. Es wird 5 Minuten mit Stickstoff gespült und dann der Druck auf 11,8 MPa erhöht. Bei 220 °C und 10 Minuten Behandlungszeit wird die gesamte Hemicellulose gelöst, allerdings auch etwa ein Drittel des Lignins. Nach der gewünschten Reaktionszeit wird die Suspension in Autoklav 4 überführt, wobei durch den Druckunterschied eine plötzliche Entspannung unter starken Scherkräften eintritt. Die Suspension wird auf 80 °C gekühlt und auf Normaldruck gebracht.

Die flüssige Phase wird nun durch Filtration abgetrennt. Sie enthält bei vollständiger Lösung der Hemicellulose allerdings nur etwa 20 % der Pentosane des

Maisstengels in monomerer Form, ein größerer Teil liegt als Oligosaccharide vor. Durch entsprechende Nachhydrolyse kann der Anteil der Pentosen aber auf 50-60 % des theoretisch möglichen erhöht werden. Um diese Werte zu erreichen, müssen zur Autohydrolyse allerdings mildere Bedingungen angewandt werden, als zur völligen Lösung der Hemicellulose notwendig sind. Bei den dazu nötigen Bedingungen können nämlich auch mit einer Nachhydrolyse nicht mehr als 20 % Zuckerausbeute erzielt werden. Anscheinend werden durch die extremen Bedingungen zwar die Zucker gleich bis in ihre monomere Form gespalten, ein großer Teil wird aber in Abbauprodukte wie Furfural umgewandelt. Der Glucosegehalt der Lösung beträgt nie mehr als 8 %, die Cellulose wird also kaum angegriffen und bleibt mit dem restlichen Lignin als feste Fraktion zurück.

3.1.3 Radioaktive Bestrahlung als Vorbehandlung

Eine weitere Vorbehandlungsmethode ist die Bearbeitung mit Hochenergiestrahlung. Die verbesserte Hydrolysierbarkeit des behandelten Materials beruht hauptsächlich auf einer Depolymerisierung der Cellulose. Dadurch wird die spezifische Oberfläche des Materials erhöht und Enzyme oder Säuremoleküle können leichter eindringen.

Eine erhöhte Anzahl von Phenolgruppen in bestrahlten Holzfasern weist darauf hin, daß auch das Lignin durch die Bestrahlung angegriffen wird.

Die die Hydrolyserate verbessernde Wirkung der Bestrahlung wird ab ca. 10 kGy bemerkbar (häufig werden Strahlungswerte um 1 MGy angewandt) und ist proportional zur Strahlungsdosis. Außerdem ist die Wirkung stark vom jeweiligen Material abhängig.

Der große Nachteil der Vorbehandlung mit Gammastrahlung besteht in den hohen Kosten. Die Methode ist aufgrund der hohen Investitionskosten nicht wirtschaftlich. Allerdings läßt sich die benötigte Dosis erheblich senken, wenn die Bestrahlung mit einer chemischen Behandlung kombiniert wird.^{18,17)}

Der Effekt von 2 % NaOH und Bestrahlung mit Dosen von 500 kGy auf die Ausbeute von Glucose nach enzymatischer Hydrolyse von Maisstengeln wurden untersucht. Die Glucoseausbeute ließ sich von 20 % auf 43 % erhöhen.³²⁾

3.2 Chemische Vorbehandlung

Chemische Vorbehandlungsmethoden werden verwendet, um das Lignin zu entfernen und die kristallinen Strukturen aufzubrechen oder die Hemicellulose abzutrennen.

Obwohl chemische Behandlungsmethoden normalerweise sehr effektiv sind, haben sie auch Nachteile, die nicht übersehen werden dürfen. Man braucht speziell korrosionsgeschützte Ausrüstung, nach der Behandlung muß das Material intensiv gespült werden und es fallen Abfälle an, die mit den eingesetzten Chemikalien erheblich verunreinigt sind.¹⁸⁾

Verschiedenste Methoden werden in der Literatur angeführt, die im Anschluß genauer beschrieben werden sollen:

Behandlung mit:

- Alkali
- Säure
- Gasen
- Oxidationsmitteln
- Lösungsmittel für Cellulose
- Extraktionsmittel

3.2.1 Vorbehandlung mit Alkali

Alkalischen Reagenzien wie Natronlauge, Kaliumhydroxyd, Calciumhydroxid oder Ammoniumhydroxid²⁹⁾ verbessern die biologische Verwertbarkeit von lignocellulärem Material.¹⁸⁾

Behandlung mit Lauge ist eine herkömmliche Methode zur kompletten Delignifizierung von Biomasse in der Papierindustrie. Alkalische Lösungen in Konzentrationen um 5 % werden dort bei Temperaturen zwischen 130 °C und 180 °C angewandt. Allerdings sind diese Bedingungen zur Delignifizierung hauptsächlich auf die Bildung von Zellstoff ausgerichtet, wobei große Teile der Hemicellulose durch Lösung verloren gehen. Außerdem werden durch die hohen Temperaturen auch signifikante Teile der Kohlenhydratfraktion zu Zuckersäuren abgebaut. Diese Produkte werden nicht verwertet und sind für viele Organismen toxisch.

Bei Anwendung niedrigerer Temperaturen und längeren Behandlungszeiten wird die Hemicellulose nicht gelöst. Diese Methode wurde ursprünglich hauptsächlich zur Aufwertung von Stroh zu Futtermittel verwendet. Für die Vorbehandlung von Biomasse vor einer Fermentation oder Hydrolyse sind dieselben Bedingungen vorteilhaft.³³⁾

Die Behandlung mit verdünnter Lauge verursacht Spaltung intermolekularer Esterbindungen und damit Quellung des Materials. Kovalente Bindungen zwischen den Kohlenhydraten und Lignin werden angegriffen. Die Struktur des Lignins wird zerstört und Teile gehen in Lösung. Auch Hemicellulose kann als Oligomere gelöst werden. Außerdem vermindert Lauge den Polymerisationsgrad der Kohlenhydrate und verringert die Kristallinität. Aufgrund dieser Faktoren kommt es zu einer Erhöhung der spezifischen Oberfläche. Enzyme können dadurch leichter in die Zellwand eindringen.^{17,18)} Der Grad der Lösung von Lignin und Hemicellulose hängt von der Wahl der Vorbehandlungsparameter ab. Ein geringer Teil der Cellulose kann als Glucoseoligomere in Lösung gehen.³⁴⁾

Gegenüber der Behandlung mit Säure weisen alkalische Prozesse eine geringere Zersetzungsrate der gewonnenen Zucker auf.²⁹⁾

3.2.1.1 Vorbehandlung mit Natronlauge

Die Bedingungen, unter denen Natronlauge (NaOH) zur Behandlung von Maisernterückständen verwendet wird, sind vielfältig. Im Folgenden soll ein Überblick über in der Literatur beschriebene Verfahren gegeben werden (siehe auch Tabelle 6, Seite 36).

A.Singh et al.³⁵⁾ wendeten eine Vorbehandlung mit Natronlauge zur Verbesserung des Wachstums von *Aspergillus niger* auf Maiskolben an. Hierzu wurden die auf 20 mm gehackten Maiskolben mit zweiprozentiger Natronlauge eine Stunde bei 121 °C autoklaviert. Danach wurde filtriert, mit deionisiertem Wasser gewaschen und mit HCl neutralisiert.

Zur Vorbehandlung von Kolben aus denen mittels Xylanase Xylose gewonnen werden sollte, verwendeten Gokhale et al.³⁶⁾ weit mildere Bedingungen. Die Kolben wurden mit 0,1 M NaOH 16 Stunden bei 28-30 °C vorbehandelt. Durch die milden Bedingungen wird die Lösung der Hemicellulose während der Vorbehandlung minimiert.

Tanaka et al.²⁶⁾ untersuchten verschiedene Vorbehandlungsmethoden für enzymatische Hydrolyse von Maisstover, darunter auch NaOH. Sie verwendeten 75 mL 0,27 M (1 Gew.%), 0,51 M (2 Gew.%) oder 0,89 M (3 Gew.%) NaOH/5 g Stroh. Die Suspension wurde zuerst für einige Stunden eingeweicht und dann für eine Stunde auf 86 °C erhitzt.

Die Ergebnisse dreier Versuche mit verschiedenen Einweichzeiten sind in Tab. 4 (Seite 29) zusammen gefaßt. Die Entfernung von Lignin scheint unabhängig von der Einweichzeit zu sein.

In Bezug auf Gewichtsverlust und Ligninabbau konnte keine Abhängigkeit von der Konzentration festgestellt werden. Der Verlust an gesamten Kohlenhydraten nach der Vorbehandlung mit 0,89 M NaOH war mit 11,5 % aber höher als bei niedrigeren Konzentrationen. Auch das Hydrolyseergebniss lag mit 38,5 g reduzierenden Zuckern pro 100 g ursprünglich enthaltenen Kohlenhydraten signifikant unter den durchschnittlichen 42,6 g reduzierenden Zuckern bei Einsatz von 0,51 M NaOH.

Tab. 4: Effekt der Vorbehandlung mit 0,51 M NaOH auf Maisstover. Alle Angaben in Prozent des getrockneten Ausgangsmaterials ²⁶⁾

Einweichzeit [h]	Gewichtsverlust [%]	Flüssige Phase		Feste Phase			Verlust an Kohlenhydraten [%]
		Reduzierende Zucker [%]	Kohlenhydrate [%]	Cellulose [%]	Kohlehydrate [%]	Lignin [%]	
0	37,0	2,3	9,2	25,5	51,8	5,5	10,8
6	30,4	2,5	10,6	25,3	55,0	6,4	6,2
12	31,1	1,9	10,2	26,3	53,0	5,6	8,6
Stover unbeh.				30,0	71,8	17,1	

Eshafi et al.²⁸⁾ führten ebenfalls eine Vorbehandlung von Maisstover vor einer enzymatischer Hydrolyse durch. Sie setzten 1 M NaOH bei Raumtemperatur ein. Die Behandlungszeit betrug zwischen einer und 24 Stunden (siehe enzymatische Hydrolyse Tab. 21). Die Cellulose wurde vollständig hydrolysiert, auch wenn die Vorbehandlungszeit weniger als 7 Stunden betrug, allerdings unter dem Einsatz hoher Enzymkonzentrationen (ca. 3000 FPU/g trockener Biomasse).

Bei höherer Temperatur führten MacDonald et al.³⁴⁾ ihre Vorbehandlungsversuche mit Maisstover durch. Die Temperatur wurde zwischen 100 °C und 150 °C, die Natronlaugekonzentration zwischen 0 und 2 Gew.% (0,51 M) und die Behandlungszeit zwischen 1 und 60 Minuten variiert. Die Entscheidung für diese Bereiche fiel aufgrund der Überlegung, daß die Kosten durch möglichst geringe Verbrauchsmengen an Natronlauge und Energie minimiert werden sollten, gleichzeitig aber das Medium sterilisiert werden mußte.

Für die Behandlung wurde ein 1 Liter Parr Druckreaktor verwendet, der mit einer automatischen Temperaturkontrolle, einer Heiz/Kühl-Schlange und einem Rührer mit variabler Geschwindigkeit ausgerüstete war. Der Rührer wurde insofern modifiziert, als daß ein offener 50 mL Stahl-Becher an der Rührerwelle direkt über der Flüssigkeitsoberfläche angebracht wurde. Dieser wurde mit der gewünschten Menge an NaOH gefüllt. Während der Aufheizphase wurde der Rührer noch mit geringerer Umdrehungszahl gefahren. Erst als die gewünschte Temperatur erreicht wurde, wurde die Rührerdrehzahl erhöht, wodurch die Natronlauge aus dem Becher geschleudert wurde. Dadurch kam es zu einer schnellen Vermischung, der Kontakt mit dem Substrat schon während der Aufheizphase wurde aber vermieden. Außerdem wurde durch diese Technik dafür gesorgt, daß es nicht durch die nachträgliche Einbringung der kalten Natronlauge zu Temperaturschwankungen im Reaktor kam.

Der verwendete Maisstover hatte einen Cellulosegehalt von ca. 32 %. Das Ausmaß an Lösung anderer Inhaltsstoffe scheint zwischen 0 und 1 % Natronlauge proportional zur Konzentration zu steigen. Über 1 % flacht die Kurve ab. Etwa 85 % des Lösevorgangs gehen bereits in der ersten Minute vor sich. Ohne NaOH werden im untersuchten Temperaturbereich 18-28 %, bei Vorbehandlung mit 1-2 % Natronlauge hingegen 55-65 % des Ausgangsmaterials gelöst. Der theoretische Gewichtsverlust bei vollkommener Lösung aller Stoffe außer Cellulose läge bei 68 % .

Das Ausmaß der Löslichkeit hängt auch von der Temperatur ab, wobei die größten Änderungen zwischen 100 °C und 140 °C auftreten. Zwischen 140 °C und 150 °C ist der Einfluß der Temperatur nicht mehr so groß.

Nach Hydrolyse mit dem Enzym Onozuka R-10 aus *Trichoderma viride* können aus unvorbehandeltem Stover 20 g Zucker/100 g Stover gewonnen werden. Nach

einer 15 minütigen Behandlung mit 2% iger NaOH bei 150 °C wurden durch die Hydrolyse aus dem festen Rückstand 28 g Glucose/100 g Stover und 24 g Glucoseäquivalent/100 g Stover aus der gelösten Fraktion gewonnen. (siehe Abb. 12) Die 28 g Zucker entsprechen 80 % der theoretisch aus Stover erhältlichen Glucose, die 24 g Zucker entsprechen 64 % der aus der gelösten Hemicellulose und Cellulose möglichen Zucker. Dieser eher geringe Wert ist dadurch zu erklären, daß das verwendete Enzymgemisch hauptsächlich Cellulase aber wenig Xylanase enthält.

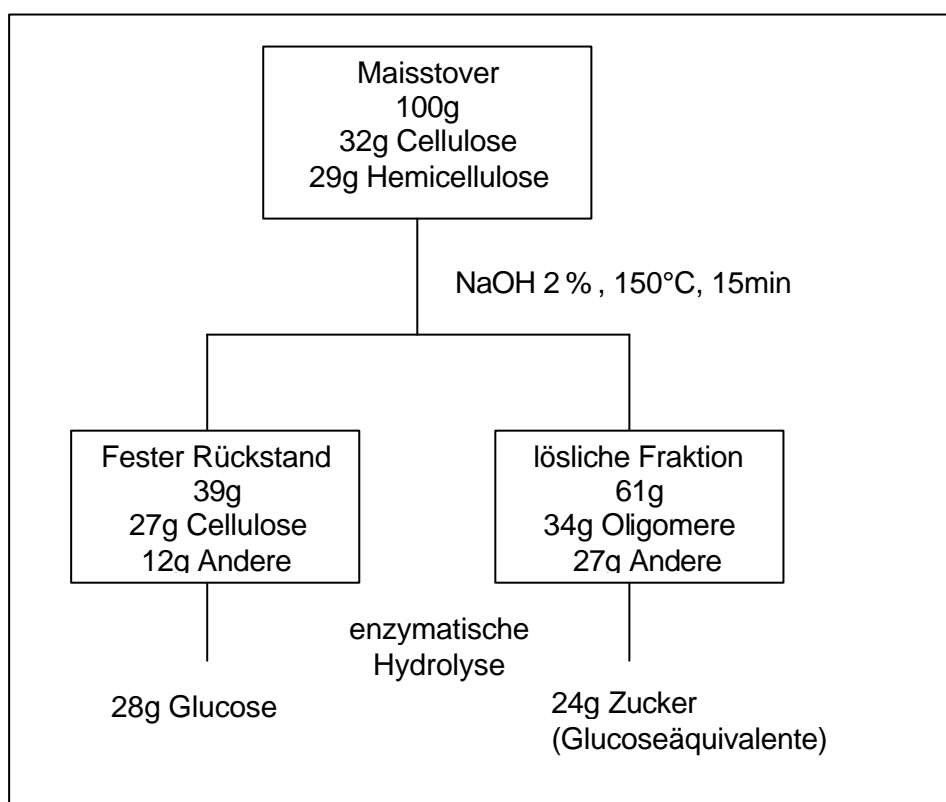


Abb.12: Übersicht über die Ergebnisse der NaOH Vorbehandlung und enzymatischen Hydrolyse von Maisstover³⁴⁾

3.2.1.2 Vorbehandlung mit Calciumhydroxid

Auch wenn Natronlauge das meist untersuchte Reagenz zur alkalischen Vorbehandlung ist, so sollte doch auch besonderes Augenmerk auf Calciumhydroxid ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) gelegt werden. Es ist ein effektives Vorbehandlungsmittel und außerdem das billigste der vier oben genannten (siehe Tab. 5).

Tab. 5: Preise von alkalischen Reagenzien laut Chemical Marketing Reporter 1996 ³⁷⁾

Reagenz	Preis	Lieferart
Calciumhydroxid	0,10 \$/kg	als CaO –Kies, 25 t Lose
Ammoniumhydroxid	0,18 \$/kg	anhydr. NH_3 , Dünger, Tank
Natriumhydroxid	0,36 \$/kg	Sodaasche, 58 % Na_2O
Kaliumhydroxid	3,78 \$/kg	Pottasche, 88-92 % , 400 Pfund Trommeln

Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß man das Calcium aus einem wässrigen Reaktionssystem als unlösliches Calciumcarbonat durch Neutralisation zurückgewinnen kann. Die Neutralisation kann mit billigem Kohlendioxid erfolgen. Das Calciumhydroxid kann dann mit bekannten Kalktechnologien wiedergewonnen werden.

Kaar et al. ²⁷⁾ verwendeten Calciumhydroxid zur Behandlung von Maisstover vor der enzymatischen Hydrolyse. Sie setzten Konzentrationen bis zu 0,1 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$ /g trockener Biomasse ein. Die Reaktionstemperatur betrug 120 °C, die Vorbehandlungszeit 5 h. Sie erzielten damit eine Verbesserung der Zuckerausbeute von 50 mg Glucoseäquivalent/g trockene Biomasse auf 450 mg Glucoseäquivalent/g trockene Biomasse.

1999 untersuchten Kaar et al. ²⁹⁾ die Verwendung von Calciumhydroxid zur Vorbehandlung von Maisstover unter besonderer Berücksichtigung der Auswirkungen von fünf Parametern:

- Vorbehandlungszeit
- Temperatur
- $\text{Ca}(\text{OH})_2$ Konzentration
- Wassermenge
- Korngröße (siehe Kapitel 3.1.1)

Für jede der untersuchten Reaktionstemperaturen ergab sich eine optimale Behandlungszeit: bei 100 °C 13,5 h, bei 120 °C 4,5 h, bei 130 °C 3 h und bei 140 °C 2 h.

Zur Auswahl einer optimalen Temperatur für einen technischen Prozeß muß zwischen der Zweckmäßigkeit der Behandlung und den Ausrüstungskosten abgewogen werden. Kaar et al. wählten 120 °C als optimale Temperatur, weil der entstehende Druck von 101 kPa noch nicht extrem hoch ist, andererseits aber die Behandlungszeit von 4 h nicht wesentlich höher liegt als bei möglichen höheren Temperaturen.

Die Zuckerausbeuten der enzymatischen Hydrolyse erhöhten sich bei Änderung der Kalkkonzentration von 182 mg Glucoseäquivalent/g trockener Biomasse bei Behandlung ohne Kalk auf 462 mg Glucoseäquivalent/g trockener Biomasse für eine Kalkkonzentration von 0,1g Ca(OH)₂/g trockener Biomasse. Eine weitere Erhöhung der Kalkkonzentration zeigte keine besseren Ausbeuten mehr. Eine gut geeignete Kalkkonzentration läge bei 0,075 g Ca(OH)₂/g trockene Biomasse, weil die erhaltene Zuckerausbeute beinahe so hoch wie mit 0,1 g ist, aber ein Viertel der Kalkmenge eingespart wird.

Die Wassermenge spielt keine große Rolle bei der Reaktion, wahrscheinlich würden auch noch unter 5 g Wasser/g trockene Biomasse ein gutes Ergebnis liefern, vorausgesetzt, daß noch eine gute Rührung gewährleistet ist.

Durch Waschen der vorbehandelten Biomasse bevor diese vor der Hydrolyse neutralisiert wird, kann bis zu 50 % der Säuremenge, die zur Neutralisation notwendig ist, eingespart werden. Allerdings verringert sich dadurch die Zuckerausbeute um 10 % .

Durch diese Vorbehandlung werden 2,6 g der ursprünglichen 39 g Glucan/100 g trockenes Rohmaterial und 5,8 g der ursprünglichen 20,1 g Xylan/100 g trockene Rohmaterial und 8,5 g der ursprünglichen 21,5 g Ligin/100 g trockenes Rohmaterial gelöst.

3.2.1.3 Vorbehandlung mit Ammoniak

Ammoniak (NH_3) hat eine Reihe von Eigenschaften, die für die Verarbeitung von lignocellulärer Biomasse gut geeignet sind. Er wirkt delignifizierend und ist daher ein wichtiges Reagenz um Lignin als eigene, reine Fraktion abzutrennen. Außerdem hydrolysiert Ammoniak Glucuronsäureesterbrücken, spaltet Bindungen zwischen Lignin und Hemicellulose und verändert die Faserstruktur von Cellulose. Die hohe Flüchtigkeit von Ammoniak im Vergleich zu Wasser macht es leicht, ihn aus einer wässrigen Mischung abzutrennen. Soweit bekannt ist, bilden sich bei einer Wechselwirkung zwischen Ammoniak, Lignin und Kohlenhydraten bei erhöhter Temperatur keine giftigen Nebenprodukte.

Bei milden Bedingungen kann Ammoniak genutzt werden, um das Lignin aus lignocellulärem Material zu lösen, ohne daß auch die Hemicellulose entfernt wird. So verwenden Cao et al.³⁸⁾ 10 % ige Ammoniumhydroxidlösung zur Behandlung von auf 3 mm gemahlene Maiskolben. 20 g Kolbenpulver werden mit 100 mL NH_4OH (10 %) versetzt und 24 h bei 26 °C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wird filtriert und gewaschen. Der feste Rückstand kann zur Hemicellulose- und Cellulosegewinnung weiterverwendet werden, während aus dem Filtrat durch Verdampfung unter Vakuum (bei 45 °C) der Ammoniak zurückgewonnen wird (98 % Rückgewinnung). Dabei fällt das Lignin in relativ reiner Form aus.^{38,39)}

Eine andere Methode zur Behandlung von Biomasse mit Ammoniak ist das **AFEX-Verfahren (Ammonia fiber explosion)**. Im Gegensatz zur Dampfexplosion arbeitet dieses Verfahren bei niedrigeren Temperaturen (30-80 °C)⁴⁰⁾ unter hohem Druck. Der Vorteil besteht darin, daß die Zersetzung der gebildeten Zucker, die normalerweise bei hohen Temperaturen in erheblichem Maße auftritt, stark zurückgedrängt wird. Die Biomasse wird mit flüssigem Ammoniak (nicht Ammoniumhydroxid) für weniger als 30 Minuten behandelt. Dann wird der Druck plötzlich vermindert und die Biomasse explodiert buchstäblich. Der Ammoniak verdampft und kann wiedergewonnen und wiederverwendet werden. Eine Wiedergewinnungsrate von 99 % wird leicht erreicht. Der Rückstand kann dann gut einer Hydrolyse unterzogen werden. Im Vergleich zur sanfteren Einweichmethode werden aber auch Teile der Hemicellulose aus dem festen Rückstand gelöst, die dann bei dessen Hydrolyse verloren gehen.

Beim **Ammonia Recycled Percolation Process (ARP)** wird die Biomasse in einen beheizten Reaktor gepackt. Das Reagenz (wässrige Ammoniaklösung) wird langsam durchgeleitet und dahinter gesammelt. Im Sammelbehälter wird mit Stickstoff ein Gegendruck aufgebaut, um ein Verdampfen des Ammoniaks zu verhindern. Nach Ende der Reaktion wird der Ammoniak aus der flüssigen Phase abgedampft und wiedergewonnen (über 99%). Der Rest der flüssigen Phase wird einer sauren Nachhydrolyse unterzogen, um die darin enthaltenen oligomeren Zucker aus den Hemicellulosen in Monomere zu spalten. Im Zuge dieser sauren Behandlung fällt das Lignin aus und kann nach einer Aufreinigung weiterverwendete werden.²³⁾ Durch die sofortige Entfernung des Produktstroms aus dem Reaktionsraum kann beim Perkolationsreaktor eine Rekondensation des Lignins verhindert werden.⁴¹⁾

Iyer et al.²³⁾ untersuchten die Anwendung dieses Prozesses bei einem Gemisch aus Maiskolben und –stover (CCSM = corn cob/stover mixture). Sie stellten fest, daß bei einer einstündigen Behandlung mit 10% igem Ammoniak bei einer Reaktionstemperatur von 170 °C mit einer Flußrate von 1 mL/min 56% der Hemicellulose aber weniger als 8% der Cellulose gelöst werden. Diese Werte bleiben relativ konstant für Ammoniakkonzentrationen zwischen 2,5 und 20%. Der Anteil des gelösten Lignins ändert sich allerdings gravierend von 52% auf 81%. Die optimale Ammoniakkonzentration liegt aber bei 10%, da damit bereits 79% Delignifizierung erricht werden. Aus der Lösung können nur 50-60% des ursprünglichen Lignins gefällt und wiedergewonnen werden.

In Bezug auf die Reaktionszeit wurde festgestellt, daß der Großteil der Lösevorgänge bereits in den ersten 15 Minuten geschieht und diese Zeit für die Behandlung von CCSM ausreichend ist.

Durch diese Vorbehandlung wird die enzymatische Hydrolysierbarkeit der Cellulose von 23% auf 94% angehoben.

Tab. 6: Zusammenfassung der Literatur zur Vorbehandlung von Maisernterückständen mit Laugen

Maispflanzenteil	Lauge	Zeit	Temperatur [°C]	Ergebnis	Literatur
	NaOH				
Kolben	2 %	1 h	121	Besseres Wachstum von <i>Aspergillus niger</i> Rückstand: Cellulose: - 15,8% Hemicell.: -78,9 % Lignin: - 16,8%	35)
Kolben	0,4 %	16 h	28 - 30	28 mal mehr reduzierende Zucker nach Hydrolyse mit Xylanase	36)
Stover	2 %	1 h	86	Rückstand: Cellulose: -15 % Gesamte Kohlenhydrate: -18 % Lignin: -68 %	26)
Stover	3,9 %	3 h	Raumtemp.	3-fach bessere Cellulosekonversion in enzymatischer Hydrolyse 1,4-fach bessere Hemicellulosekonversion	28)
Stover	2 %	5 min	150	65 % des Stovers gelöst, 2,5 mehr Zucker nach Hydrolyse	34)
	Ca(OH)₂				
Stover	0,1g/g St.	5h	120	5 mal mehr Glucoseäquivalente nach Hydrolyse	27)
Stover	0,1g/g St.	5h	120	Rückstand: Glucose: -7 % Xylose: -29 % Lignin: -40 %	29)
	NH₃				
Kolben	10 %	24h	26	Lignin: -80 - 90 %	38)
Kolben + Stover	10 %	1 h	170	Rückstand: Cellulose: - <8% Hemicellulose: -56 % Lignin: -64 %	23)

3.2.2 Vorbehandlung mit Säure

Der Vorbehandlung von lignocellulärem Material mit verdünnten anorganischen Säuren kommt eine besonders große Bedeutung zu. Der größte Vorteil dieser Behandlungsmethode ist, daß Hemicellulosen spezifisch hydrolysiert werden. Lignin und der überwiegende Teil der Cellulose werden bei den gewählten milden Bedingungen nicht angegriffen, sodaß eine physikalische Trennung zwischen den in Lösung befindlichen Pentosen und den im festen Rückstand verbleibenden Hexosen ermöglicht wird.⁴⁰⁾ (siehe Abb. 13)

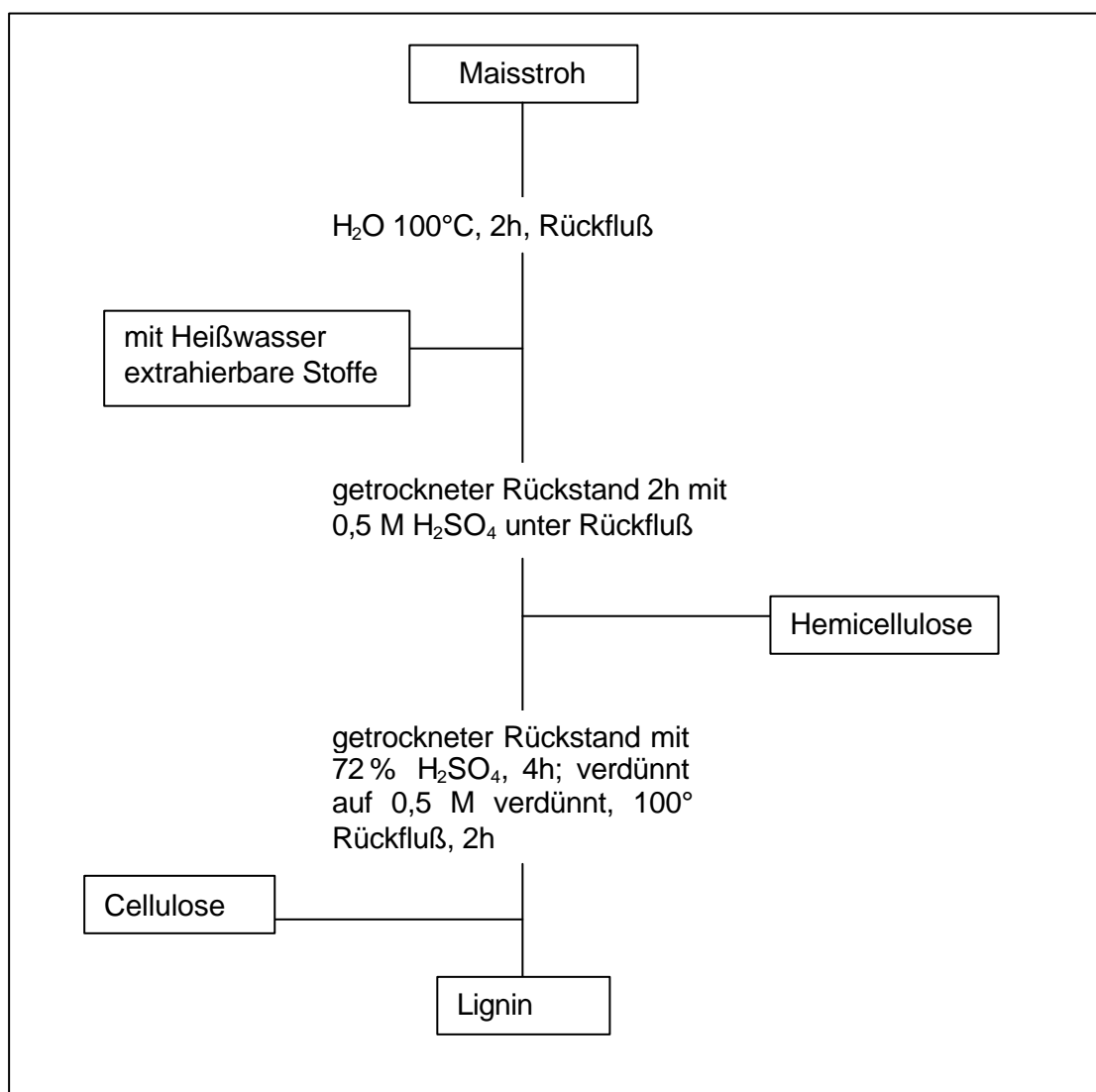


Abb. 13: Fraktionierung von Maisstroh¹⁷⁾ - Statt der Cellulosehydrolyse mit konzentrierter Schwefelsäure kann natürlich auch eine enzymatische Hydrolyse folgen.

Während zum Beispiel im Dampfexplosionsprozeß die Umwandlungsrate von Xylan in Xylosen bei 50 - 60 % liegt, können mit verdünnter Säure mindestens 80 - 90 % erreicht werden. Dies liegt daran, daß durch die milderen Bedingungen die Bildung von Zersetzungsprodukten wie Furfural und anderen stärker zurückgedrängt wird.⁸⁾ Natürlich wird durch die effektive Entfernung der Hemicellulose auch die Struktur des lignocellulären Materials wesentlich gelockert und die Hydrolyse der Cellulose erleichtert. Weitere Vorteile der Vorbehandlung mit verdünnter Säure bestehen darin, daß keine teure korrosionsfeste Ausrüstung notwendig ist und auch keine großen Umweltprobleme wie bei der Verwendung konzentrierter Säure zu erwarten sind.¹²⁾

Nachteile sind trotz den milderen Bedingungen die Bildung von Zersetzungsprodukten, die zwar nur in geringen Mengen auftreten, aber toxisch auf Mikroorganismen wirken und daher trotzdem bei nachfolgenden Fermentationen stören. Außerdem wird durch die Säurebehandlung eine Neutralisation des Rückstandes notwendig.⁴⁰⁾

Für die Säurehydrolyse der Hemicellulose wird hauptsächlich Schwefelsäure verwendet. Daneben finden auch Salzsäure und Phosphorsäure Anwendung.¹⁸⁾

Die im folgenden beschriebenen Literaturstellen zu Vorbehandlung von Maisstroh mit Säure sind in Tabelle 7, Seite 42 zusammengefaßt.

3.2.2.1 Vorbehandlung mit Schwefelsäure

Der Konzentrationsbereich von Schwefelsäure (H_2SO_4) für die Hydrolyse der Hemicellulose in Maisernterückständen liegt in der Literatur durchwegs zwischen 0,5 und 1,2 %^{22,42,18,17,30,43, 44,26,45)}, vereinzelt werden auch höhere Konzentrationen (bis 9 %) angewandt.^{24,46,39)} Die verwendeten oder untersuchten Temperaturen liegen meist zwischen 100 und 180 °C.^{22,42,18,17,43,46,24,39,44,26,45)} Wird bei Temperaturen um 100 °C gearbeitet, liegen die Reaktionszeiten über einer Stunde^{17,24,39)}, außerdem wird häufig eine mehrstündige Einweichzeit^{24,26)} bei Raumtemperatur vorgeschaltet. Bei Reaktionstemperaturen über 140 °C werden bei Reaktionszeiten von oft weit unter 30 Minuten bereits gute Ergebnisse erzielt.^{22,42,18,17,46,44,45)}

Torget et al.²²⁾ behandelten Maiskolben und Maisstover mit 0,45 - 0,5 % H_2SO_4 in einem 1L Reaktor aus rostfreiem Stahl mit einem Impellermixer und einem Einlaßventil für Säureeinlaß unter Druck. Damit die Rührung noch einwandfrei funktioniert, darf der Feststoffgehalt im Reaktor nur 10 % betragen. Die Säurekonzentration war so gewählt, daß nach 30 minütiger Reaktion bei 140 °C der pH-Wert im Reaktor noch 1,35 - 1,40 betrug. Bei Maiskolben werden bereits bei 140 °C und einer Behandlungszeit von nur 5 Minuten Xylan, Galactan, Arabinan und Acetylgruppen zu 100 % gelöst. 26 % des Lignin werden entfernt und 14 % des Glucan werden ebenfalls gelöst. Unter den selben Bedingungen werden aus Maisstover 93 % des Xylans, 100 % Galactan, Arabinan und Acetylgruppen, 9 % des Lignins und 25 % des Glucans gelöst. Die Hydrolyserate für Cellulose bei enzymatischer Hydrolyse liegt bei 5 - 10 minütiger Vorbehandlung bei 160 °C für beide Substrate bei 90 - 100 % . Bei 140 °C und 30 bis 60 Minuten Behandlungszeit können bei Maisstover 79 bis 86 % der Cellulose enzymatisch hydrolysiert werden, für Maiskolben genügen bereits fünf Minuten für eine Hydrolyserate von 90 % .

Schell et al.⁴²⁾ untersuchten die Vorbehandlung von Maisstover bei höherer Feststoffkonzentration. Das auf 3,2 mm gemahlene und gesiebte Material wurde zuerst einen Tag in 1 % Schwefelsäure bei einem Feststoffgehalt von 10 % eingeweicht. Dann wurde die überstehende Flüssigkeit durch Vakuumfiltration entfernt und der Rückstand (20 bis 30 % Feststoffgehalt) in einen 1 m langen zylindrischen Reaktor mit 0,15 m Durchmesser transferiert. Der Reaktor wurde zunächst durch einen Heizmantel auf 120 °C vorgeheizt. Dann wurde die Temperatur durch Dampfeinlaß schnell auf die gewünschte Reaktionstemperatur von 140 - 180 °C gebracht. Nach der gewünschten Zeit wurde die Reaktion durch Belüftung beendet. Nach 20 min bei 180 °C ist der Glucangehalt im Rückstand von 38,6 % im

Ausgangsmaterial auf 53,9 % gestiegen, während der Xylangehalt von 20,4 % auf 3,5 % zurückgegangen ist. Die enzymatische Hydrolysierbarkeit beträgt bei einer Behandlung bei 160 °C bei Reaktionszeiten von 5, 10 und 20 Minuten 56 %, 65 % und 78 %. Bei 10 minütiger Vorbehandlung bei 180 °C liegt die Hydrolysierbarkeit bei 96 %.

Tanka et al.²⁶⁾ untersuchten die Vorbehandlung von Maisstover mit 0,16 g H₂SO₄/g trockener Biomasse (ca. 1 % Säurekonzentration). Bei einem der Experimente wurde die Biomasse vor der Behandlung bei 86 °C 6 h bei Raumtemperatur eingeweicht. Nach der Vorbehandlung waren im festen Rückstand ohne Einweichzeit 77,7 % der ursprünglichen Kohlenhydrate davon 96,7 % der Cellulose, mit Einweichen 79,0 % der ursprünglichen Kohlenhydrate, davon 96 % der Cellulose enthalten. 7,3 bzw. 8,3 % der eingesetzten Masse wurden als reduzierende Zucker in der flüssigen Phase erhalten. Das Lignin wurde im Gegensatz zur Behandlung mit Natronlauge praktisch gar nicht gelöst. Diese schlechte Entfernung wirkt sich dann auch bei der enzymatischen Hydrolyse der Cellulose negativ aus. Es konnten nur ca. 16 % des eingesetzten Gewichts als reduzierende Zucker gewonnen werden (bei Natronlaugevorbehandlung ca. 28 %).

Esteghlalian et al.⁴⁵⁾ führten die Säurehydrolyse von Maisstover in einem 600 mL Reaktor aus rostfreiem Stahl mit einem Feststoffgehalt von 10 % durch (Fa. Parr). Die wässrige Lösung der Biomasse wurde auf die gewünschte Temperatur von 140 bis 180 °C vorgeheizt und die Reaktion durch die Beimengung der Säure gestartet. Säurekonzentrationen zwischen 0,6 und 1,2 % wurden untersucht. Die Resultate zeigen, daß zum Beispiel mit 0,9 % Säure bei 180 °C ca. 90 % des Xylans in der ersten Minute gelöst werden kann.

Elshafei et al.²⁸⁾ führten die Vorbehandlung mit verdünnter Schwefelsäure (1M) bei nur 25 °C durch. Welcher Teil der Hemicellulose bei dieser Temperatur gelöst werden konnte, wurde nicht angegeben, die Umsetzung der Cellulose zu Zuckern liegt bei 24 stündiger Vorbehandlung und 24 stündiger Hydrolysezeit trotz Einsatz großer Enzymmengen (>2000 IU/g Stover) nur bei 41 %, was nicht wesentlich mehr als ohne Vorbehandlung ist.

3.2.2.2 Vorbehandlung mit Salzsäure

Cao et al.³⁸⁾ verwendeten zur Fraktionierung von Maiskolben nicht Schwefel sondern Salzsäure (HCl). Der Rückstand nach einer Ammoniakbehandlung zur Ligninabtrennung wurde mit 0,3 M HCl 1h bei 100-108 °C gekocht.

Elshafi et al.²⁸⁾ untersuchten auch die Anwendung von 1M HCl zur Vorbehandlung von Maisstover bei 25 °C. Die erzielten Ergebnisse entsprechen denjenigen nach der Vorbehandlung mit Schwefelsäure, nach 24 stündiger Vorbehandlung und 24 stündiger Hydrolyse mit >2000 IU/g Stover konnten 40% der Cellulose umgewandelt werden.

Die Nachbehandlung nach einer Säurebehandlung umfaßt immer eine physikalische Trennung zwischen flüssiger Phase und Rückstand. Der Rückstand wird vor der Hydrolyse eventuell mit Wasser gewaschen, um Säurereste zu entfernen.^{38,45)}

Tab. 7: Zusammenfassung der Literatur zur Vorbehandlung von Maisernterückständen mit Säure

Maispflanzenteil	Säure	Zeit	Temperatur [°C]	Ergebnis	Literatur
	H₂SO₄				
Kolben	0,5 %	5 min	140	Gelöst: 100 % Xylan 26 % Lignin 14 % Glucan	22)
Stover	0,5 %	5 min	140	Gelöst: 93 % Xylan 9 % Lignin 25 % Glucan	22)
Stover	1 %	20 min	180	Zusammensetzung vor Behandlung: 38,6 % Glucan, 20,4 % Xylan Zusammensetzung nach Behandlung: 53,9 % Glucan, 3,5 % Xylan	42)
Stover	1 %	6 h	86	Rückstand: Cellulose: -4 % Gesamte Kohlenhydrate: -23 % Lignin: -0 %	26)
Stover	0,9 %	1 min	180	90 % des Xylans gelöst	45)
Stover	10%	24h	25	1,1-fach bessere Cellulosekonversion in enzymatischer Hydrolyse 1,05-fach bessere Hemicellulosekonversion	28)
	HCl				
Stover	3,6%	24h	25	1,1-fach bessere Cellulosekonversion in enzymatischer Hydrolyse 1,4-fach bessere Hemicellulosekonversion	28)

3.2.3 Vorbehandlung mit Gasen

Mehrere Gase wie Chlor, Chlordioxid, Stickoxide, Ozon und Schwefeldioxid wurden zur Vorbehandlung von lignocellulärem Material verwendet.^{18,17)} In den meisten Fällen verursachen die Gase die Lösung von Lignin aus der Biomasse. Der Vorteil von Gasen besteht darin, daß eine gleichmäßige Verteilung im ganzen Substrat sichergestellt ist, es gibt keinerlei Transportlimitierungen. Andererseits sind Gase schwerer zu handhaben als Flüssigkeiten, und die oft entstehenden Belastungen der Umwelt sind problematisch.

Ozon (O₃) greift sowohl Lignin als auch die Kohlenhydrate an. Allerdings ist die Geschwindigkeit der Kohlenhydratzersetzung wesentlich kleiner wodurch 50 % Delignifizierung erreichbar sind.¹⁷⁾ Ein Vorteil des Einsatzes von Ozon besteht auch darin, daß bei der Behandlung kaum umweltbelastendes Material entsteht.

Schwefeldioxid (SO₂) kann ebenfalls als Vorbehandlungsmittel verwendet werden. Dabei wird das lignocelluläre Material bei 120 °C 2-3 h mit gasförmigen SO₂ zur Reaktion gebracht. Anscheinend zerstört das SO₂ die Lignin-Kohlenhydratbindung und depolymerisiert das Lignin.¹⁸⁾

Schwefeldioxid wird auch als Zusatz bei der Dampfvorbehandlung verwendet. Durch das SO₂ wird die Konzentration der Protonen, die die Lösung der Hemicellulose katalysieren, gesteigert. Der pH-Wert wird aber nicht so drastisch gesenkt, wie dies mit Mineralsäuren der Fall ist. Dadurch wird der Zuckerabbau minimiert.⁴⁷⁾

Parekh et al.⁴⁷⁾ untersuchten die Anwendung von SO₂ zusammen mit Dampfexplosion zur Vorbehandlung von Maisstover.

Die Durchführung erfolgte in einem 7 L Laborreaktor als Batchverfahren. Das Fest/Flüssig-Verhältnis betrug 1:2, es wurden 3 % SO₂ (auf Trockengewichtsbasis) zugesetzt. Die Dampfbehandlung dauerte 30 min bei 160 °C und 0,5 MPa (5 bar). Die Rückstände wurden nach der Vorbehandlung nicht gewaschen sondern direkt einer enzymatischen Hydrolyse zugeführt. 15 % der polymeren Glucose und 79 % der restlichen Zucker wurden gelöst. Die enzymatische Hydrolyse lieferte eine Ausbeute von 86,5 % der gesamt möglichen Zucker.

3.2.4 Vorbehandlung mit Oxidationsmittel

In Tabelle 8 sind Oxidationsmittel, die zur Vorbehandlung von lignocellulärem Material verwendet wurden, aufgelistet.¹⁸⁾ Sie führen zur chemischen Oxidation von Lignin, wandeln es in wasserlösliche Produkte um und machen die Cellulose so für enzymatischen Abbau zugänglich. Manche der Reagenzien verursachen bei längeren Behandlungszeiten und höheren Temperaturen¹⁷⁾ strukturelle Veränderung der Cellulose und deren Lösung, wobei einige nur amorphe Regionen angreifen können, andere auch kristalline. Dieser unerwünschte Abbau von Glucan kann durch geeignete Wahl der Reaktionstemperatur vermieden werden, für Wasserstoffperoxid zum Beispiel, wenn unter 170 °C gearbeitet wird.

Einige der aufgezählten Mittel liegen als Gase vor und wurden bereits dort erwähnt.

Tab. 8: Oxidationsmittel für lignocelluläres Material¹⁸⁾

Natriumchlorit (NaClO ₂)	Natriumhypochlorit (NaOCl)
Kaliumbromat (KBrO ₃)	Wasserstoffperoxyd (H ₂ O ₂)
Kaliumiodat (KIO ₃)	Stickstoffdioxid (NO ₂)
Kaliumpermanganat (KMnO ₄)	Chlordioxid (ClO ₂)
Kaliumperoxydisulfat (K ₂ S ₂ O ₈)	Schwefeldioxid (SO ₂)
Kaliumperchlorat (KClO ₄)	Ozon (O ₃)

Nach Gould (1984) setzt Maisstover bei einer Behandlung mit einer alkalischen (pH = 11,5) Lösung von Wasserstoffperoxyd (H₂O₂ : Substrat = 1:4 Massenanteile) ca. die Hälfte des Lignins und 80 % der Hemicellulosen frei.^{17,41)}

Kim et al.⁴¹⁾ untersuchten die Verbesserung einer Variante der Vorbehandlung mit Ammoniak – des Ammonia Recycled Percolation Process (ARP, siehe Kapitel 2.2.1.3) - durch Zusatz von Wasserstoffperoxyd. Abbildung 14 zeigt das Prozeßschema.

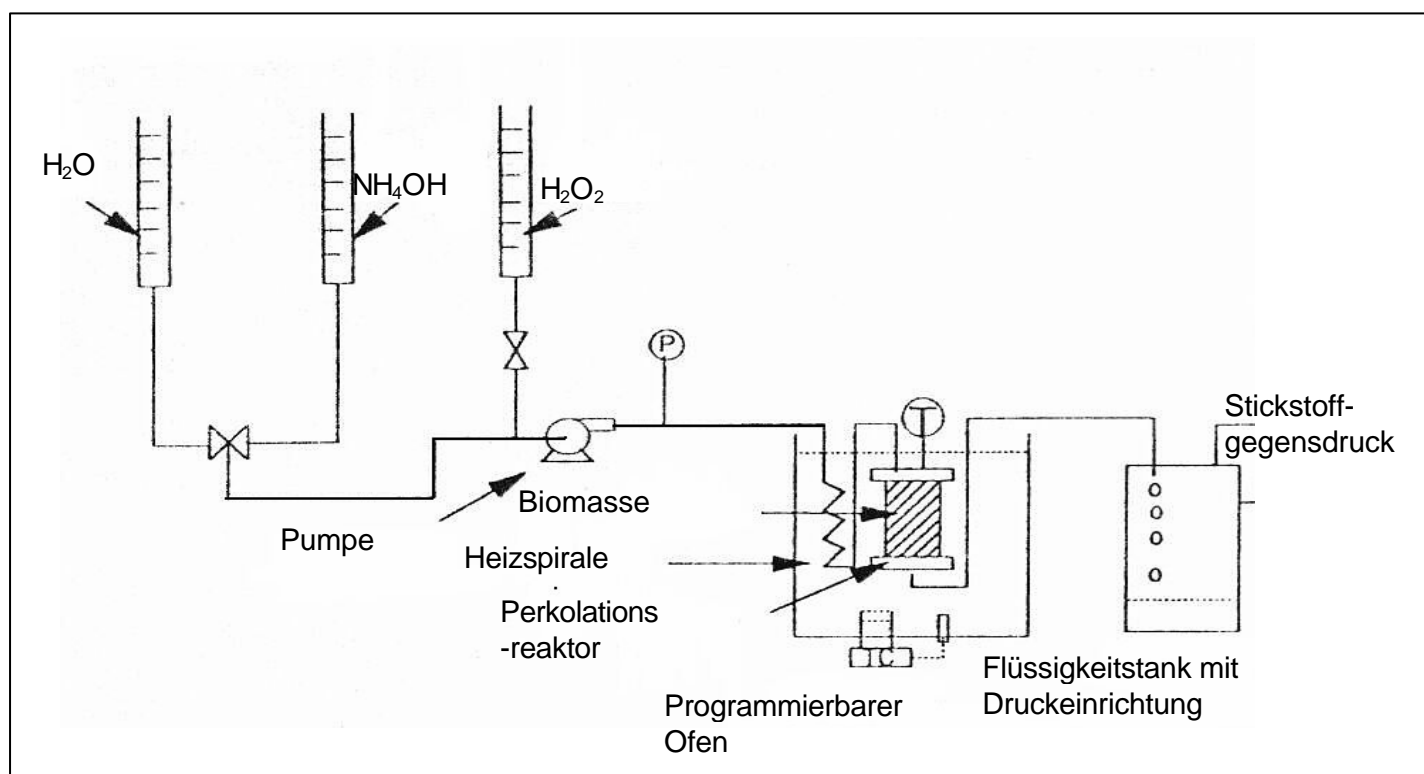


Abb. 14: Schema des Ammonium-Wasserstoffperoxid Perkolations Prozesses ⁴¹⁾

Die Ergebnisse bei 170 °C Reaktionstemperatur, 0,84 g H₂O₂ / g Biomasse, 1 mL / min Flußrate und 90 Minuten Reaktionszeit sind Tabelle 9 zu entnehmen. Das Substrat war Maisstover (hier: mit Kolben).

Tab. 9: Ergebnisse des ARP Verfahren mit und ohne H₂O₂ ⁴¹⁾

	Ammoniak-Konzentration [Massen%]		Glucan [%] ^{b)}	XMG ^{a)} [%] ^{b)}	Delignifizierung [%] ^{b)}	fester Rückstand [%] ^{c)}
ohne H ₂ O ₂	10 ^{d)}	fl ^{e)}	6,8	60,1		
		f	91,6	39,4	85,1	49,2
mit H ₂ O ₂	20	fl	10,5	80,7		
		f	80,6	19,7	98,3	37,1

a) Xylan+Mannan+Galactan

b) als Prozent des Gehalts des jeweiligen Stoffes im trockenen Ausgangsmaterial

c) als Prozent des trockenen Ausgangsmaterials

d) Flußrate: 2mL / min

e) fl: Hydrolysat nach Nachhydrolyse, f: fester Rückstand

Durch pH-Wertsenkung während der Ammoniakrückgewinnung und der Nachhydrolyse der Hemicellulosenoligomere können 61,8% des Lignins im Ausgangsmaterial aus der Lösung wieder gefällt werden. Die Hydrolysierbarkeit der Rückstandes betrug bei 72 stündiger enzymatischer Behandlung 95%, bei 24 stündiger Behandlung 84%.

3.2.5 Vorbehandlung mit Cellulose-Lösungsmittel und Quellmitteln

Eine weitere Variante der Vorbehandlung von Biomasserückständen ist die Behandlung mit verschiedensten Cellulosequellmitteln oder Celluloselösungsmitteln. Sie reduzieren die Kristallinität der Cellulose und können das Lignin aus dem lignocellulärem Material entfernen. Manche Chemikalien führen auch zur Lösung der Cellulose. ⁴⁸⁾

Die eingesetzten Lösungsmittel kann man in vier Kategorien unterteilen:

- Konzentrierte (45-80 Gew. %) Mineralsäuren
- Quartäre Ammoniumbasen oder andere Ammoniumverbindungen
- Aprotische Reagentien wie Dimethylsulfoxid oder Dimethylformamid
- Übergangsmetallkomplexe

Einige Übergangsmetallkomplexe wurden genauer untersucht. Anscheinend bilden sie Chelate mit den C₂ und C₃ Hydroxylgruppen der Cellulose. Dadurch werden dort die Wasserstoffbrücken gestört. Zusätzlich bewirken viele der Lösungsmittel eine Nettoladung der Cellulose. Durch diese Effekte wird die lignocelluläre Struktur destabilisiert und Cellulose kann in Lösung gehen. Einige geeignete Chemikalien sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tab. 10: Celluloselösungsmittel ¹⁸⁾

Calciumthiocyanat	Bis-(β-γ-dihydroxy propyl)-disulfid
Strontiumthiocyanat	CMCS
quaternäre Pyridiumsalze	Cadoxen
Hydrazinhydrat	Phosphorsäure
Benzyltrimethylammoniumhydrat	Salpetersäure
Methylamin in DMSO	Salzsäure
Triethylaminoxid	Schwefelsäure
Kupferammoniumhydroxid	

CMCS (chelating metal caustic swelling) wurde als Gruppenbegriff für Metallkomplexlösungsmittel (siehe Tabelle 11, Seite 48) eingeführt, bei denen die Bildung einer Chelatbindung durch Quellungseffekte durch Alkali unterstützt wird.

Große Nachteile dieser Chemikalien stellen aber ihre hohen Kosten und die große Giftigkeit dar, wodurch ein Einsatz im größeren Maßstab nicht möglich ist. ⁴⁸⁾

Tab. 11: Celluloselösende Metallkomplexe

Trivialname	Metall	Ligand
Cadoxen	Cd ²⁺	NH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NH ₂ Ethylendiamin
Cuen	Cu ²⁺	Ethylendiamin
Zincoxen	Zn ²⁺	Ethylendiamin
Nioxam	Ni ²⁺	NH ₃
Cuoxam	Cu ²⁺	NH ₃
FeTNa	Fe ³⁺	$\begin{array}{c} \text{HO} \quad \text{OH} \\ \quad \\ (\text{COOH})\text{-CH-CH-}(\text{COOH}) \\ \text{Weinsäure} \end{array}$

Cadoxen ist eine wäßrige Lösung von Ethylendiamin und Cadmiumoxid¹⁷⁾ (siehe Tab. 9). Tsao et al.¹⁸⁾ ermittelten 1978, daß damit bis zu 10 % der Cellulose aus Biomasse gelöst werden können. Aus dieser kann dann Glucose mit 90 %iger Ausbeute gewonnen werden. Heute ist eine Anwendung dieser Chemikalie aufgrund der extremen Toxizität von Cadmium nicht denkbar.

Hamilton et al.⁴⁸⁾ untersuchten die Anwendung von FeTNa bei der Behandlung von Maisernterückständen. Die Grundlage des Lösungsmittels bildet eine 1,5 M Natronaugelösung (98 g/L), die als Quellmittel wirkt. Außer Eisenchlorid (81,1 g/L) und Natriumtartrat (207,1 g/L) ist auch Natriumsulfit (50,0 g/L) ein Bestandteil. Es wird als Antioxidans zur Stabilisierung der Lösung eingesetzt.

Durch eine Vorhydrolyse mit 5%iger Schwefelsäure bei 90 °C wird ein lignocelluläres Material mit 62 % Celluloseanteil gewonnen. Die Lignocellulose wurde dann mit dem FeTNa in verschiedenen Konzentrationen von 4:1 bis 12:1 (Lösungsmittelvolumen:Lignocellulose) oder nur mit 1,5 M NaOH behandelt. Die anschließende Hydrolyse mit Cellulase ergab Celluloseumwandlungsraten, die zwei bis dreimal höher waren, als die für unbehandelte Lignocellulose. In den besten Fällen wurden an die 80 % Hydrolyserate nach 24 h erreicht. Lignocellulose, die nur mit Natronlauge bearbeitet wurde, gab 5 bis 25 % schlechtere Umwandlungsraten, je nachdem welche Enzymmenge verwendet wurde. Bei höheren Enzymmengen (>7,5 IU/g Lignocellulose) wirkt reine Natronlauge fast ebenso gut wie das Lösungsmittel, bei niedrigerem Enzymeinsatz (2,5 IU/g Lignocellulose) ist ein Einsatz des Lösungsmittels überlegenswert.

3.2.6 Vorbehandlung durch Extraktion

Der Vorteil von organischen Lösungsmitteln in der Vorbehandlung von lignocellulärem Material besteht in ihrer Selektivität bei der Delignifizierung.³³⁾ Auch Natronlauge zeigt zum Beispiel eine gute Fähigkeit zur Lösung von Lignin, es werden aber immer größere Teile der Hemicellulose mitentfernt. Mit geeigneten organischen Lösungsmitteln kann dieses Problem zurückgedrängt werden.

Die Extraktion von Lignin durch organische Lösungsmittel ist mit und ohne Verwendung von Mineralsäuren als Katalysatoren untersucht worden. In beiden Fällen wirken organische Säuren, die während dem Prozess freigesetzt werden, beschleunigend auf die Lösung des Lignins.¹⁸⁾

Lösungsmittel, die in solchen Extraktionsverfahren angewandt wurden, sind zum Beispiel Ethanol, Butanol, Ethylamin, Phenol, Acton, Ethylenglycol, Tritethylenglycol, Dimethylsulfoxid, Benzen. Der Einsatz mancher dieser Lösungsmittel wie Benzen wird heute aufgrund ihrer Toxizität oder Kanzerogenität kaum in Frage kommen, bei anderen wäre sowohl für die wirtschaftliche als auch für die Umweltbeeinträchtigungen betreffende Beurteilung die Möglichkeit zur Rückgewinnung und Wiederverwertung von großer Bedeutung.

Avgerinos et al.³³⁾ untersuchten den Einsatz von Ethanol bei der alkalischen Vorbehandlung von Maisstover. Die Behandlung mit Natronlauge allein ist zwar recht effektiv in Bezug auf die Delignifikation, allerdings wird immer auch ein signifikanter Teil der Hemicellulose mit abgebaut (siehe Tab. 12). Durch den Zusatz von Ethanol kann dieser Verlust deutlich verringert werden.

Tab. 12: Delignifizierung von Maisstover mit 0,2 M NaOH³³⁾

Tempertatur [° C]	Zeit [h]	Ligninabbau %	Verlust an Pentosan %
121	0,25	91	42
60	24	81	38
25	72	62	38

Der gemahlene Stover wurde mit 0,2 M NaOH und bis zu 95 % EtOH versetzt. Die Untersuchungen wurden bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Die Reaktionsgefäße wurden während der Extraktion nicht geschüttelt.

Durch Zusatz von Ethanol kann der Abbau von Kohlenhydraten zurückgedrängt werden. Bei 25 °C und 72 h Behandlungszeit sinkt der Verlust an α -Cellulose und Pentosanen von 24 % auf 5 % bei Steigerung der Ethanolgehalts von 0 % auf 50 % . Der Einsatz des Alkohols ist bei hohen Temperaturen allerdings nicht so wirkungsvoll wie bei niedrigen. Bei 121 °C ist der Kohlenhydratverlust immer signifikant (über 20 %). Zwischen 60 °C und 25 °C sinkt der Verlust von 15 % ohne Ethanolzusatz auf 5 % bei 50 % Ethanolzusatz. Die Delignifizierung nimmt mit der Temperatur ab von 81 % auf 68 % . Ein Ethanolgehalt von über 60 % führt zu einer Senkung des Ligninabbaus, in reinem Ethanol ist Lignin kaum löslich.

In Tabelle 13 sind die Ergebnisse der Extraktion bei 25 °C und 0 bzw. 50% Ethanolzusatz zusammengefaßt.

Tab. 13: Zusammensetzung von Maisstover vor und nach der Extraktion mit 50 % EtOH/H₂O und 0,2 M NaOH bei 25 °C , 72h.

	vor der Extraktion [g]	nach der Extraktion [g]	Abbau [%]
Gesamter Feststoff	100,0	76,8	23,2
α-Cellulose	32,2	31,6	1,9
Pentosan	29,4	26,9	8,5
Lignin	13,2	4,4	66,7
Asche	9,0	7,7	14,4
Unbestimmt	16,4	6,2	62,2

Die Autoren stellten fest, daß Rührung während der Extraktion in den ersten 2 Stunden große Steigerungen in der gelösten Ligninmenge mit sich bringt. Bei 200 rpm Rührergeschwindigkeit wurden mit 50 % Ethanolzusatz bei 25 °C in diesem Zeitraum bereits 50 % des Lignin entfernt, ohne Rührung waren es nur 30 % . Nach 72 h wird aber mit oder ohne Rührung die maximale Delignifikationsrate von etwa 70 % erreicht. Bei einer folgenden Fermentation der Kohlenhydrate mit einer Mischkultur aus zwei Stämmen (*Clostridium thermocellum* und *Clostridium thermosaccharolyticum*) zur Ethanolgewinnung konnten durchschnittlich 87 % der Zucker verwertet werden.

Tanaka et al.²⁶⁾ untersuchten den Einsatz von Ethylendiamin, n-Butylamin (n-BA), Acetonitril 70 % und Ethanol 70 % zur Vorbehandlung von Maisstover.

Der gemahlene Stover wurde jeweils mit dem Lösungsmittel versetzt und 12 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde bei manchen Ansätzen mit Wasser verdünnt bzw. bei Ethylendiamin und n-BA bei einigen Experimenten auch mit Methanol versetzt (zur Erniedrigung der Rückflußtemperatur). Die Ansätze mit n-BA bzw. Ethylendiamin wurden dann 30 Minuten unter Rückfluß gekocht (86,5 °C bzw. 81 °C), die Ansätze mit Ethanol oder Acetonitril wurden 3 h auf Rückfluß gehalten. Diesen zwei Ansätzen wurde zu Beginn 2 % HCl zugesetzt. Danach wurde der Rückstand gewaschen und mit H₂SO₄ oder NaOH neutralisiert. Die Ergebnisse dieser Vorbehandlung sind in Tab. 14 (Seite 52) zusammengefaßt.

Die besten Ergebnisse in einer nachgeschalteten enzymatischen Hydrolyse erzielten die mit EDA oder n-BA behandelten Proben. Sie weisen beide eine gute Quellfähigkeit auf. n-BA hat aber den großen Vorteil, daß es durch seinen niedrigen Siedepunkt gut von Wasser getrennt und wiedergewonnen werden kann. Als die besten Vorbehandlungsbedingungen geben die Autoren an: 155 g Trockengewicht / L Substratsuspension, 1 mm Teilchengröße, 12 h Einweichzeit, in 100 % n-BA, 30 min Rückfluß bei 40 % n-BA in Wasser bei 86,5 °C. Auf diese Weise können 44,5 % der ursprünglich vorhandenen Kohlenhydrate schlußendlich nach der enzymatischen Hydrolyse in reduzierende Zucker umgewandelt werden.

Tab. 14: Effekt der Vorbehandlung mit 70 % EtOH, 70 % CH₃CN mit 2 % HCl, EDA mit MeOH oder n-BA/H₂O (mit oder ohne MeOH) auf Maisstover. Alle Angaben in Prozent des getrockneten Ausgangsmaterials ²⁶⁾

Lösungs- mittel	Einweich- zeit [h]	Gewichts- verlust [%]	Flüssige Phase		Feste Phase			Verlust an Kohlenhydraten [%]
			Reduzierende Zucker [%]	Kohlenhydrate [%]	Cellulose [%]	Kohlenhydrate [%]	Lignin [%]	
CH ₃ CN	0	54,3	22,0	24,4	21,7	37,3	5,9	8,3
CH ₃ CN	12	54,0	17,5	22,1	22,2	30,9	5,7	17,0
EtOH	0	38,1	8,4	8,6	27,4	48,9	11,1	12,5
EDA/MeOH	12	19,1	5,0	6,7	27,6	58,9	7,5	4,4
n-BA	12	32,3	0,9	7,0	27,9	56,7	7,9	6,3
n-BA/MeOH	0	21,4	0,9	3,4	28,9	68,6	10,0	0,0
n-BA/MeOH	12	22,5	1,7	3,6	28,5	63,7	0	2,7
Stover unbeh.					30,0	71,8	17,1	

3.3 Biologische Vorbehandlung

Die biologische Vorbehandlung von lignocellulärem Material basiert auf der Katalyse von Reaktionen durch ganze Zellen oder isolierte Enzyme. Im Bereich der Vorbehandlung von lignocellulärem Material werden die Bidelignifikation und die Entfernung der Hemicellulosen mittels Enzymen beschrieben. Letzteres wird unter Kapitel 4.3.2 *Hemicellulasen* behandelt.

3.3.1 Bidelignifikation

Der biologische Abbau von lignocellulärem Pflanzenmaterial durch saprophytische Mikroorganismen ist ein wichtiger Teil des Kohlenstoff-Sauerstoff-Zyklus in der Biosphäre. Die Mechanismen sind anscheinend sehr effektiv, da es zu keiner Anreicherung des Materials kommt. Lignin wird entweder direkt zu CO₂ und H₂O abgebaut oder in Humus umgewandelt, der gegen weiteren biologischen Abbau sehr resistent ist.⁴⁹⁾

Der Abbau von Lignin durch verschiedene Mikroorganismen kann zur Behandlung von lignocellulärem Material zur besseren Verwertbarkeit eingesetzt werden. Die Hauptanwendungsgebiete dieser Methode liegen herkömmlicherweise allerdings nicht in der Vorbehandlung zur Verzuckerung sondern in der Papierindustrie und der Aufwertung von Ernterückständen zu Tierfutter. Um die Umsetzungsgeschwindigkeiten für eine Vorbehandlung vor einer Hydrolyse in industriellem Maßstab auf akzeptable Werte zu heben, könnten die Mikroorganismen genetisch verändert werden.¹⁸⁾

Ligninabbauende Mikroorganismen:

Obwohl angenommen wird, daß der Abbau von Lignin in der Natur durch konzertierte Arbeit von Pilzen, Bakterien und der Mikroflora des Bodens stattfindet, sind Pilze in dieser Beziehung doch die herausragenden und auch am besten untersuchten Organismen unter den ligninabbauenden Bodenbewohnern.

Pilze

Basierend hauptsächlich auf der Art von Zerfall, die sie verursachen, werden Pilze in Weißfäule-, Braunfäule-, Weichfäule-Pilze (siehe Tabelle 13) und imperfekte Pilze eingeteilt. Die meisten Weißfäulepilze sind Basidomyceten, einige Ascomyceten. Braunfäulepilze gehören zu den Basidomyceten, Weichfäule-Pilze zu den Ascomyceten. Es gilt als allgemein anerkannt, daß die komplexen Polymere des

Lignins zuerst von Basidiomyceten angegriffen und dann von Ascomyceten und imperfekten Pilzen weiter abgebaut werden.

Weißfäulepilze greifen unveränderte Ligninpolymere an, indem sie interligninäre Bindungen wie C_α-C_β, β-Arylether, C1-C_α und aromatische Ringe spalten. Auch die Oxidation von C_α und C_α=C_β, aromatische Hydroxylierung und Demethylierung von Methoxygruppen ist möglich. Braunfäulepilze sind hauptsächlich Humusbildner, die das Lignin nur wenig verändern. Die auftretenden Veränderungen sind Demethylierung von Methoxygruppen, aromatische Hydroxylierung und limitierte Seitenkettenoxidation. Die Braunfäulepilze spalten die aromatischen Ringe des Lignins nicht effektiv und wenn sie sie öffnen, können sie die entstehenden Fragmente nicht abbauen. Weichfäule-Pilze bauen Lignin anscheinend nur langsam und unvollständig ab. Sie arbeiten hauptsächlich unter feuchten Bedingungen.⁵⁰⁾

Die besten Abbauraten werden von Weißfäulepilzen erreicht. Sie bauen entweder Cellulose, Hemicellulose und Lignin gleichzeitig ab oder verwerten selektiv nur Lignin und Hemicellulose. *Phanerochaete chrysosporium* (*Sporotrichum pulverulentum*, imperfekte Form) ist der geeignetste und am besten charakterisierte Organismus.

Der Ligninabbau in Weißfäulepilzen wird von einem Abbau der Cellulose und Hemicellulose begleitet, um die Energie für Wachstum und Metabolismus zur Verfügung zu stellen. Außerdem werden die Zucker auch für die Produktion von Wasserstoffperoxid benötigt, das beim Ligninabbau eine wichtige Rolle spielt. Um den unerwünschten Abbau von Cellulose zu minimieren, wurden von einigen Pilzen Cellulase freie Mutanten entwickelt.¹⁷⁾

Bakterien

Bakterien haben gegenüber Pilzen beim Abbau von Lignin im Boden wahrscheinlich nur eine untergeordnete Funktion. Actinomyceten sind eine bestimmte Gruppe grampositiver Bakterien, die häufig beim Abbau von organischem Material eine Rolle spielen (siehe Tabelle 15). Actinomyceten wachsen in verästelten Hyphen, die filamentösen Pilzen sehr ähnlich sind. Daher sind sie gut geeignet, um in wasserunlösliche Substrate wie Lignocellulose einzudringen. Arten, die zu den Familien *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Micromonospora* und *Nocardia* gehören, bauen lignocelluläre Biomasse ab.

Actinomyceten lösen das Lignin, während eine vollständige Mineralisierung zu CO₂ viel seltener auftritt als bei Weißfäulepilzen. Sowohl *Streptomyces viridosporus* als auch *Thermomonospora mesophila* produzieren ein mit Säure fällbares polymeres Lignin aus Mais- und Strohlignocellulose.

Auch einige Pseudomonas-, Acinetobacter-, Bacillus- und Clostridium-Stämme bauen Lignin ab.¹⁷⁾

Tab. 15: Mikroorganismen mit biolignolytische Systemen¹⁷⁾

Pilze	Bakterien
<u>Weißfäulepilze:</u>	<u>Actinomyceten:</u>
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (<i>Sporotrichum pulverulentum</i>)	<i>Arthrobacter sp.</i>
<i>Coriolus versicolor</i>	<i>Micromonospora sp.</i>
<i>Cyathus stercoreus</i>	<i>Microbiospora sp.</i>
<i>Fomes annosus</i>	<i>Nocardia sp.</i>
<i>Ganoderma stercoreus</i>	<i>Rhodococcus sp.</i>
<i>Panus conchatus</i>	<i>Streptomyces badius</i>
<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>S. cyaneus</i>
<i>Phlebia radiata</i>	<i>S. flavovirenes</i>
<i>P. gigantea</i>	<i>S. setonii</i>
<i>Trametes versicolor</i>	<i>S. viridosporus</i>
<u>Braunfäulepilze:</u>	<u>Andere Bakterien:</u>
<i>Lenzites trabea</i>	<i>Thermomonospora mesophila</i>
<i>Poria placenta</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>
<i>Serpula lacrymans</i>	<i>Bacillus sp.</i>
<u>Weichfäule-Pilze:</u>	<i>Clostridium xylanolyticum</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Xanthomonas sp.</i>
<i>Fusarium oxysporum</i>	
<i>Paecilomyces sp.</i>	

Weißfäulepilzbewuchs von Maisstover:

Karunanandaa et al.⁵¹⁾ untersuchten die Veränderung in der Zusammensetzung und die invitro Verdaubarkeit/Trockenmasse (invitro dry matter digestibility= IVDMD) von Maisstover nach dem Bewuchs mit verschiedenen Weißfäulepilzen.

Als Inokulum wurden die vier Weißfäulepilzarten auf Roggenkörnern angezüchtet. Dazu wurden 80 g Roggenkörner, 13 g Sägemehl, 1 g CaSO₄ in 120 mL Wasser 45 min bei 121 °C autoklaviert und nach dem Abkühlen mit den Pilzen beimpft. Die inokulierten Roggenkörner wurden bei Raumtemperatur gehalten und zweimal in der Woche geschüttelt, um die Bildung von Klumpen zu vermeiden.

Der Maisstover wurde auf 2 mm gemahlen, mit Wasser bei 121 °C für 35 min autoklaviert und dann mit den bewachsenen Roggenkörnern inokuliert. Die Inkubationszeit betrug 30 Tage bei 25 °C. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 zusammengefaßt.

Tab. 16: Chemische Veränderung, Verdaubarkeit und Gewichtsverlust von Maisstover durch den Bewuchs mit Weißfäulepilzen (30 Tage, 25 °C) ⁵¹⁾

	Cellulose- abbau	Hemi- cellulose- abbau	Lignin- abbau	Protein [g/ kg TG behandel- ter Stover]	IVDMD [g/ kg TG behandelter Stover]	Massen- verlust
	[%]	[%]	[%]			[%]
P. chrysosporium (wild)	66,1	70,0	58,3	128	301	45,6
P. chrysosporium (cellulasefrei)	66,6	68,6	52,8	132	307	44,7
Dichomitus squalens	39,2	61,0	42,4	104	381	31,8
Cyathus stercoreus	n.n.	40,6	21,7	84	543	3,3
unbehandelter Stover	100	100	100	68	393	n.n.

n.n. nicht nachweisbar

C. stercoreus steigerte die Verdaubarkeit signifikant stärker als alle anderen Stämme. Er baut Hemicellulose und Lignin selektiv ab und hält dadurch den Massenverlust sehr gering. Beide *P. chrysosporium* Stämme bauen Cellulose ab. Auch Lignin wird stark abgebaut, was aber nicht zu einer erhöhten Verdaubarkeit führt. Anscheinend gibt es keine direkte Korrelation zwischen Ligninabbau und Verdaubarkeit.

4 Hydrolyse der Cellulose und Hemicellulose

Im Anschluß an die Vorbehandlung erfolgt die eigentliche Gewinnung der monomeren Zucker (hauptsächlich Glucose und Xylose) durch Hydrolyse der Cellulose und Hemicellulose. Dabei werden die β (1→4)-glycosidischen Bindungen zwischen den Zuckerbausteinen der Polysaccharide gespalten. Dies kann entweder säurekatalysiert geschehen oder durch den Einsatz von Cellulose bzw. Hemicellulose spaltenden Enzymen (Cellulasen und Hemicellulasen). Tabelle 17 gibt einen Überblick über Vor- und Nachteile von Säurehydrolyse und enzymatischer Hydrolyse von Cellulose.⁵²⁾

Tab. 17: Vergleich zwischen Säurehydrolyse und enzymatischer Hydrolyse von Cellulose⁵²⁾

	Säurehydrolyse	Enzymatische Hydrolyse
Vorbehandlung	kann notwendig sein	immer notwendig
Hydrolysegeschwindigkeit	schnell (Minuten)	langsam (Stunden)
Temperatur	hoch (z.B. 200 °C)	niedrig (z.B. 45 °C)
Ausbeute	variiert ja nach Material und Prozeßführung	
Bildung störender Nebenprodukte	wahrscheinlich	unwahrscheinlich

4.1 Hydrolyse mit Säure

4.1.1 Geschichtlicher Überblick

Die Geschichte der chemischen Hydrolyse von Cellulose durch Säure geht wesentlich weiter zurück als die der enzymatischen Hydrolyse. Bereits 1812 versuchte Braconnot die Durchführung mit konzentrierter Schwefelsäure. Willstätter verwendete 1913 rauchende Salzsäure. Die erste Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure wurde von Simonsen 1888 angewandt.

Ab dem Beginn des 20. Jahrhunderts wurde die Hydrolyse zur Erzeugung von Zuckerlösungen im industriellen Maßstab in Betracht gezogen. 1910 wurde in den USA eine Anlage errichtet, in der ein Prozeß von Ewen und Tomilson mit verdünnter Schwefelsäure angewandt wurde. Einige Generationen an Prozeßverbesserungen führten schließlich zum „Scholler“- und zum „Madison“-Perkolationsprozeß. In einer Anlage vom Schollertyp wurden 0,6 % Schwefelsäure bei maximal 184°C eingesetzt. Man erzielte damit Glucosekonzentrationen von 3 % bei Celluloseumwandlungsraten von 50 %. Auch der Madisonprozeß lieferte Umwandlungsraten von 50 % und 4-5 %

Glucosekonzentration bei den selben Bedingungen. In der ehemaligen Sowjetunion waren einige kommerzielle Anlagen zur Holzverzuckerung in Betrieb.⁸⁾

Seit in den frühen 80er Jahren die enzymatische Hydrolyse zur Verzuckerung von Cellulose immer mehr Bedeutung gewonnen hat, wird die Säurehydrolyse hauptsächlich zur Gewinnung der Zucker aus Hemicellulose eingesetzt.⁵³⁾

4.1.2 Theorie der Säurehydrolyse

Abbildung 15 zeigt den vermuteten Mechanismus für die Hydrolyse mit Säure als Katalysator.

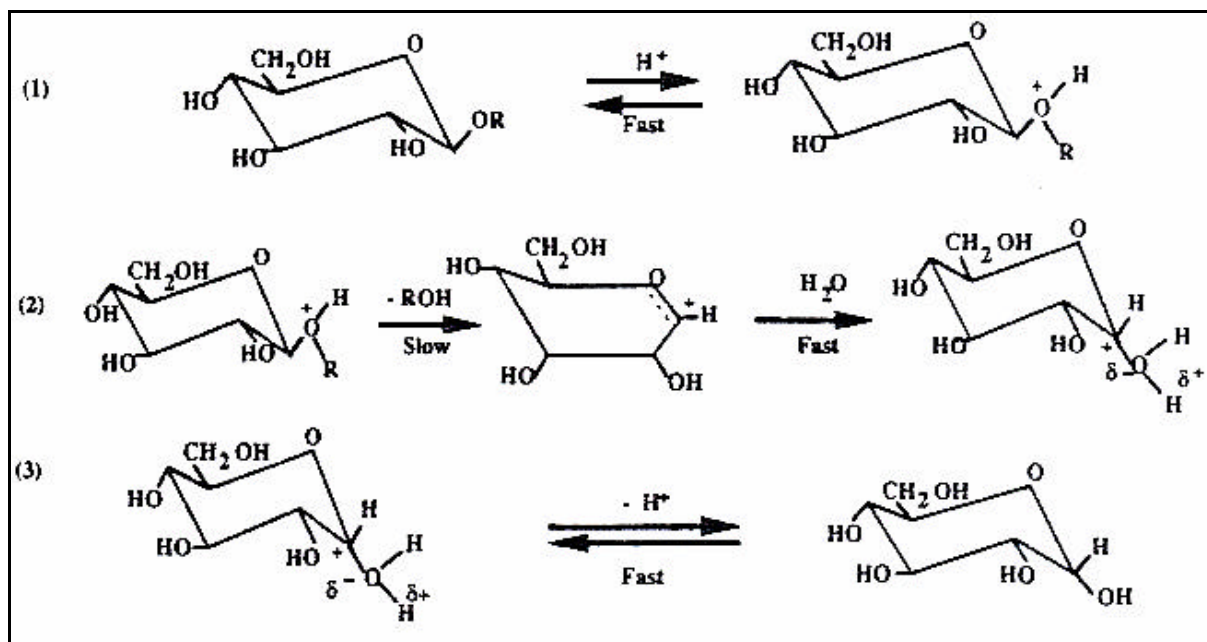


Abb. 15: Hydrolyse von Cellulose über ein cyclisches Carbeniumoxid-Ion („R“ bedeutet eine lange Kette von β -Glucose-Einheiten).⁵⁴⁾

Zu Beginn der Hydrolyse wird der glykosidische Sauerstoff schnell protoniert. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die Umwandlung des Glucosemoleküls von der Sesselform in die semiplanare Form. Gleichzeitig wird der Celluloserest abgespalten. Der nächste Schritt umfaßt die schnelle Addition von Wasser und die Abspaltung eines Protons. Xylose ist zwar ein Pentosezucker, bildet aber ebenfalls Pyranosidringe. Obiger Mechanismus gilt daher auch für die Hemicellulosehydrolyse.

Die für die Konformationsänderung nötige Energie scheint der geschwindigkeitsbestimmende Faktor der Hydrolyse zu sein. Die geringe Geschwindigkeit der

Hydrolyse von Cellulose wird durch die feste Bindung der Glucoseringe in den kristallinen Teilen der Cellulose verursacht. Diese ist auf Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Hydroxylgruppen und Wasserstoffatomen benachbarter Celluloseketten zurückzuführen.⁵⁴⁾

Die Hydrolysegeschwindigkeiten von amorpher Cellulose und Hemicellulose sind wesentlich höher, weil die Beweglichkeit der Ringe in diesen weniger kompakten Strukturen größer ist. Die Hydrolyse dieser Stoffe kann daher bereits bei milderen Bedingungen (z.B. 1 % Säurekonzentration und 150 °C) durchgeführt werden. Für die Hydrolyse von kristalliner Cellulose sind entweder bei Verwendung von verdünnter Säure höhere Temperaturen (über 180 °C) oder aber die Anwendung von konzentrierter Säure bei niedrigerer Temperatur notwendig.⁸⁾

4.1.3 Cellulosehydrolyse mit konzentrierten Säuren

Bei der Hydrolyse mit konzentrierten Säuren wird die kristalline Struktur der Cellulose durch Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen benachbarten Celluloseketten zerstört (unter Wärmeentwicklung). Die amorphe Cellulose ist nun leicht bei niedrigen Temperaturen hydrolysierbar und liefert hohe Ausbeuten praktisch ohne Nebenprodukte.⁸⁾ Ein weiterer Vorteil des Einsatzes von konzentrierten Säuren besteht in den milden Bedingungen, also geringen Drücken, und dadurch in der Vermeidung der Verwendung von Autoklaven.

Allerdings werden große Mengen konzentrierter Säure verbraucht, was einerseits vom ökonomischen Standpunkt her kaum tragbar ist und andererseits auch erhebliche Umweltprobleme oder Kosten zur Vermeidung derselben nach sich zieht.

Für die Hydrolyse von lignocellulärem Material wurden verschiedenste Säuren eingesetzt. Bergius verwendete 40 % flüssige HCl, auch gasförmige HCl und flüssige oder gasförmige Flußsäure kamen zum Einsatz. Die Reaktionstemperaturen können bei diesen konzentrierten Säuren sehr niedrig gehalten werden (23-35°). Die Kosten, die schwierige Wiedergewinnung und Gefährlichkeit der Säuren läßt eine großindustrielle Anwendung aber kaum denkbar erscheinen.

Konzentrierte Schwefelsäure ist deutlich billiger. Die Säure kann mit Kalk neutralisiert werden, was aber erhebliche Mengen an Gips liefert. Ein Vorteil in der Verwendung von Schwefelsäure gegenüber Salzsäure besteht darin, daß Gefäße aus Kunststoff verwendet werden können.⁸⁾

Nach der eigentlichen Hydrolyse der Cellulose muß oft noch eine Nachhydrolyse durchgeführt werden, um entstandene Oligomere in Monomere überzuführen.

Da sich Hemicellulose bereits bei relativen milden Bedingungen auch mit verdünnter Säure gut hydrolysieren läßt, wird sie vor einer Hydrolyse der Cellulose durch starke Säuren meist abgetrennt, um einen Abbau der aus ihr gewonnenen Zucker zu vermeiden.

4.1.3.1 Anwendung der Hydrolyse mit konzentrierter Säure auf Maisstroh

Primo-Yúfera et al.⁵⁵⁾ führten eine Hydrolyse von Maiskolben mit konzentrierter Schwefelsäure durch.

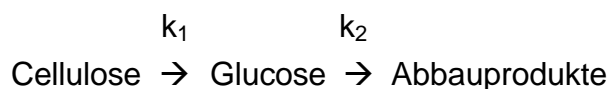
Die auf 2 mm gemahlene und getrocknete Kolben wurden zuerst mit Wasser extrahiert und dann einer Hydrolyse mit verdünnter Säure zur Abtrennung der Pentosen unterzogen. Der lignocelluläre Rest enthielt noch 3,5 % Pentosane und 38 % polymerisierte Zucker. Dem feuchten Rest der ersten Hydrolyse wurde 98 % Schwefelsäure zugefügt, bis die Konzentration bei 8 % lag. Dann wurde bei 70 °C getrocknet bis die Säurekonzentration 72 % erreichte. Danach wurde 95 % Schwefelsäure zugeführt, bis ein Fest/flüssig-Verhältnis von 1:0,5 erreicht wurde. Mit einer hydraulischen Presse wurde das Gemisch für 15 Minuten bei 50 °C unter 30 bar Druck gesetzt, damit die Säure gut in das Material eindringen konnte. Danach wurde wieder Wasser zugesetzt bis die Säurekonzentration 8 % erreichte. Die Suspension wurde 3 Stunden bei Atmosphärendruck auf 105 °C aufgeheizt, um die zuvor gebildeten Oligomere zu hydrolysieren.

256 mg reduzierende Zucker (RZ) pro Gramm trockenen Kolben konnten so erhalten werden, davon waren 235 mg RZ/g trockenen Kolben mit *Saccharomyces cerevisiae* fermentierbar. Bei Einsatz von 80 % Säure statt 95 % halbierte sich dieser Wert auf 111 mg RZ/g trockenen Kolben.

4.1.4 Cellulosehydrolyse mit verdünnter Säure

4.1.4.1 Kinetik der Cellulosehydrolyse

Das Reaktionsmuster der Säurehydrolyse mit verdünnter Säure wird durch nachstehende Abfolge zweier Reaktionen erster Ordnung dargestellt:



Die Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 werden durch Arrheniusgleichungen ausgedrückt, deren präexponentieller Faktor die Säurekonzentration beinhaltet:

$$k_i = k_{0i}[A]^{n_i}\exp(-E_i/RT) \quad (1)$$

mit $i = 1$ (Hydrolysereaktion) oder $i = 2$ (Abbaureaktion), n_i = Säureexponent, $[A]$ = Konzentration der Säure, E_i = Aktivierungsenergie.

Diese Gleichung wurde in in der Literatur beschriebenen Kinetikstudien häufig verwendet und ergab zufriedenstellende Übereinstimmung mit experimentellen Daten. Da der amorphe Teil der Cellulose bei den entsprechend hohen Temperaturen gleich zu Beginn der Reaktionszeit in Glucose übergeht, wird dieser Anteil häufig als Anfangskonzentration an Glucose in die Berechnungen einbezogen.^{53,56)}

Auch für kinetische Studien der Hydrolyse von Cellulose und Hemicellulose wurde am häufigsten Schwefelsäure eingesetzt. In diesen Studien wurde ein großer Bereich an Reaktionsbedingungen im Bezug auf Säurekonzentration und Temperatur untersucht. Die in der Literatur beschriebenen kinetischen Daten variieren stark. Dies liegt an den unterschiedlichen verwendeten Substraten und Vorbereitungsmethoden. Die Bedingungen zum Start und Abbruch der Hydrolyse differieren. Außerdem berücksichtigen viele Autoren die Neutralisationsfähigkeit der Biomasse nicht:⁵³⁾ Bei Zusatz von Säure zu Biomasse wird ein Teil der Säure neutralisiert, so daß die eigentliche Anfangskonzentration an Säure nicht der zugegebenen Menge entspricht. Maisstroh weist nach Esteghlalian et al.¹⁹⁾ eine Neutralisationsfähigkeit von 43,7 mg H_2SO_4 /g trockene Biomasse auf. Dieser im Vergleich zu anderem untersuchten pflanzlichem Material erhöhte Wert stimmt auch mit dem höheren Aschegehalt von Maisstroh überein.

4.1.4.1.1 Schlußfolgerungen für die Prozeßführung aus der Kinetik

In einem Punkt stimmen der Großteil der Kinetikstudien in der Literatur überein: Die Aktivierungsenergie liegt für die Hydrolyse höher als für die Zersetzungsreaktion. Das heißt, daß hohe Reaktionstemperaturen die Hydrolyse mehr begünstigen als die Abbaureaktion. Die Ausbeute an Glucose steigt also mit der Reaktionstemperatur. Es sollte daher eine möglichst hohe Temperatur angewandt werden. Allerdings sind den technischen Möglichkeiten hier im Bezug auf den Reaktordruck oder die Kontrolle der Reaktionszeit Grenzen gesetzt.⁵³⁾ Bei einer Säurekonzentration von 1 % und einer Temperatur von 240 °C werden über 90 % der kristallinen Cellulose bereits innerhalb der ersten 20 Sekunden der Reaktion abgebaut (siehe Abb. 16).

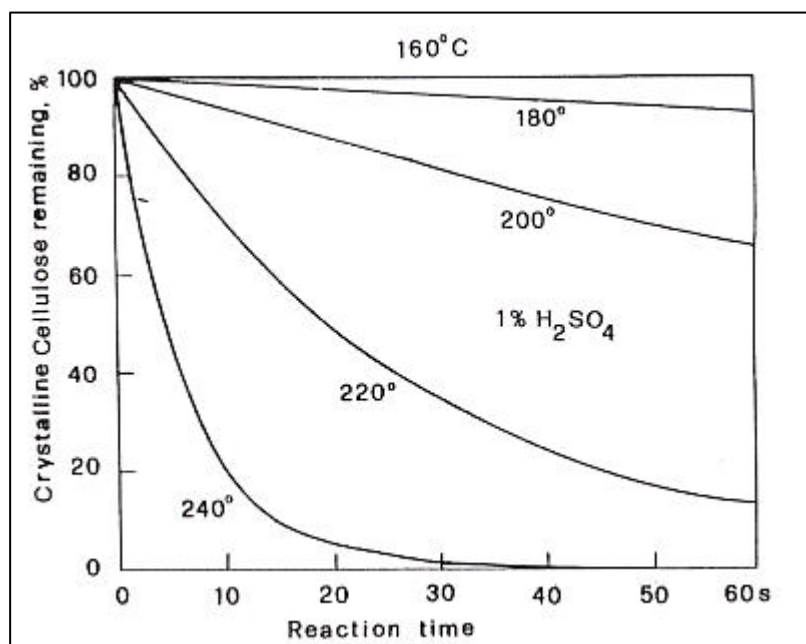


Abb. 16: Säurehydrolyse von Cellulose als Funktion von Temperatur und Zeit⁸⁾

Tabelle 18 (Seite 63) zeigt die Geschwindigkeitskonstanten für die Hydrolyse der Cellulose und die Zersetzung von Glucose bei zwei verschiedenen Säurekonzentrationen für verschiedene Temperaturen unter der Annahme von Reaktionen erster Ordnung.

Das steigende Verhältnis zwischen den Geschwindigkeitskonstanten zeigt, daß extremere Reaktionsbedingungen die Hydrolyse begünstigen.

Tab. 18: Geschwindigkeitskonstanten für die Hydrolyse von Cellulose und den Glucoseabbau (K in min^{-1})⁸⁾

Temp. [°C]	H ₂ SO ₄ 1%			H ₂ SO ₄ 0,6%		
	Kglu	Kdeg	Kglu/Kdeg	Kglu	Kdeg	Kglu/Kdeg
180	0,102	0,334	0,305	0,006	0,249	0,241
210	1,30	1,40	0,929	0,76	1,05	0,723
240	12,1	5,00	2,42	7,14	3,73	1,91

4.1.4.1.2 Zwei Kinetikbestimmungen für Maisstover

Bhandari et al.⁵⁶⁾ untersuchten die Kinetik der Maisstoverhydrolyse in einem 500 mL Parr Batchreaktor mit Kühlschlange, Rührer und Heizmantel. Der auf 0,3-0,5 mm pulverisierte Maisstover wurde bei 80-90 °C getrocknet. Dann wurde das Pulver im Reaktor bei drei verschiedenen Säurekonzentrationen (0,49, 0,92, 1,47 %) von Raumtemperatur auf eine Temperatur zwischen 160 °C und 240 °C aufgeheizt. Der Temperaturverlauf im Reaktor wurde gemessen. Bei Erreichen der gewünschten Temperatur wurde das Reaktionsgemisch innerhalb einer Minute auf 100 °C abgekühlt, indem Kühlwasser durch die Kühlschlange geführt wurde. Aus den gewonnen experimentellen Daten wurden der präexponentielle Faktor und die Aktivierungsenergie für die Arrheniusgleichung zur Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten (siehe Gleichung 1) berechnet. Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden aus den Temperatur-Zeit-Kurven mit geschätzten Arrheniusparametern berechnet, die dann über die Summe der kleinsten Fehlerquadrate solange angepaßt wurden, bis die Ergebnisse mit den experimentellen Daten übereinstimmten.

Die gefundenen Geschwindigkeitskonstanten sind in Tabelle 16 (Seite 65) wiedergegeben.

McParland et al.⁵⁷⁾ untersuchten ebenfalls die Kinetik der Säurehydrolyse von Maisstover, allerdings nicht in einem Batchreaktor sondern in einem Rohrreaktor mit Dampfeinspritzung (steam injektion) (siehe Abb. 17, Seite 64).

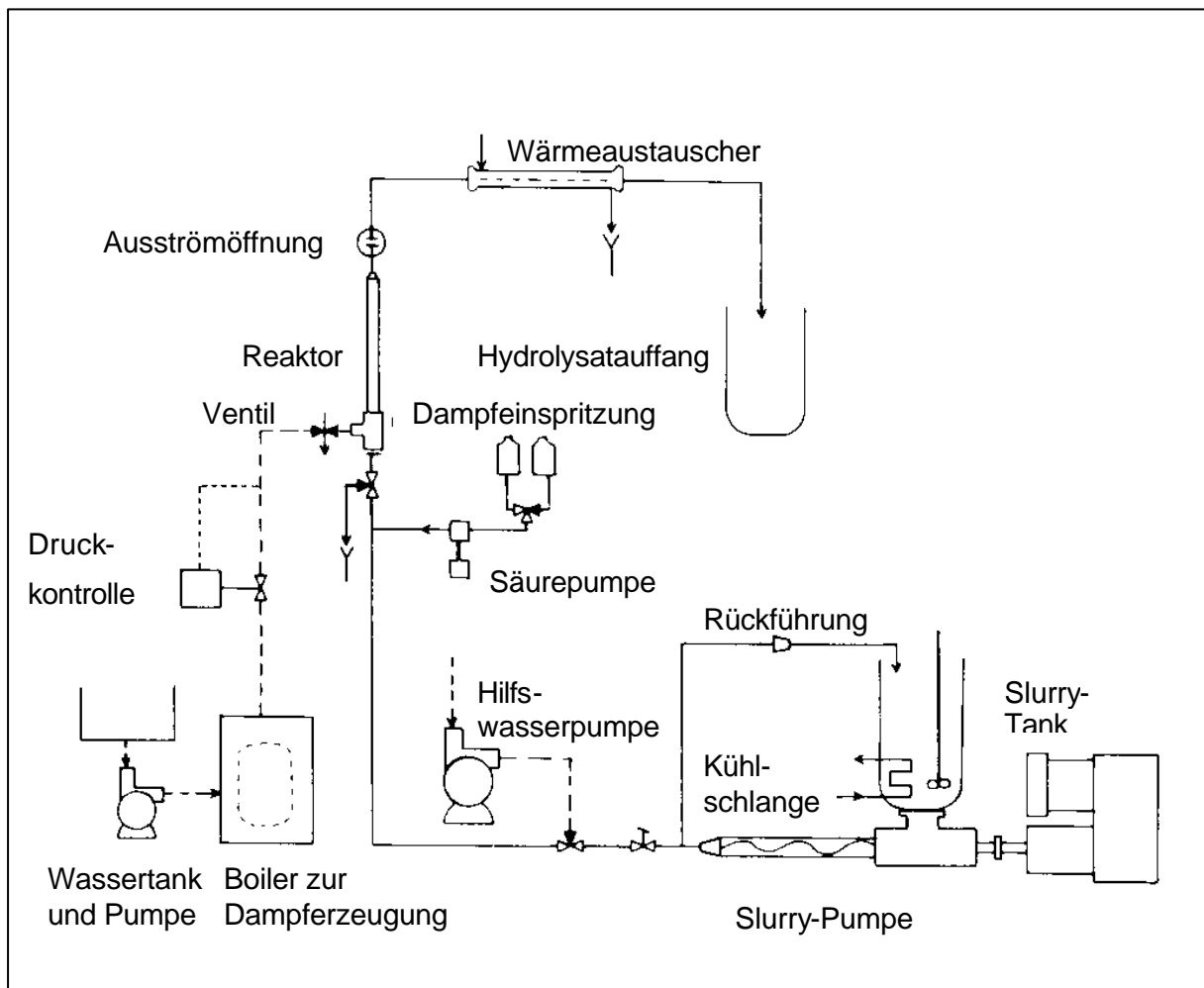


Abb.17: Prozessschema für das bench-scale, kontinuierliche Hydrolysesystem⁵⁷⁾

Die Biomassesuspension mit 13 % Stovergehalt (Slurry) wird von einem Vorratstank durch das Rohrsystem gepumpt. Kurz vor dem Reaktor wird konzentrierte Schwefelsäure zugeführt, bis im Reaktor eine Säurekonzentration von ca. 3% vorliegt. Dann wird der heiße Dampf zugeführt und dadurch die Reaktionsmischung innerhalb von 0,6 Sekunden auf 240 °C erhitzt. Im Rohrreaktor kommt es dann zur Hydrolyse. Am Ende wird über eine Düse entspannt, was zu einer Abkühlung auf 130 -140 °C führt. Die weitere Kühlung erfolgt dann über einen Wärmeaustauscher auf 40 °C, danach wird das Hydrolysat gesammelt. Die Verweilzeit im gesamten System beträgt etwa 0,2 Minuten. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten sind Tabelle 19 (Seite 65) zu entnehmen.

Tab. 19: Geschwindigkeitskonstanten für die Hydrolyse von Maisstover aus 2 Bestimmungen⁵⁷⁾

Bedingungen	k_1 [min^{-1}]	Autor
1 % Säure, 200°C, Rohr mit Dampf	0,67	McParland et al. ⁵⁷⁾
1 % Säure, 240°C, Rohr mit Dampf	10,2	
1 % Säure, 220°C, Batch	0,19	Bahandari et al. ⁵⁶⁾
2 % Säure, 220°C, Batch	1,27	

4.1.4.2 Reaktionsbedingungen

In den älteren Prozessen der Säurehydrolyse, die bis 1960 verwendet wurden, wurden hauptsächlich Schwefelsäurekonzentrationen von 0,5 - 2,0% und Temperaturen von 170 - 200 °C eingesetzt. Nach 1980 spiegelt der Einsatz von Temperaturen über 200 °C eine verfeinerte Technik wieder, die nun kurze Reaktionszeiten, hohe Temperaturen und die Korrosion gut beherrschen konnte.

Seit den späten achtziger Jahren gibt es kinetische Untersuchungen bei Temperaturen bis zu 230 °C. In diesen Forschungsarbeiten wurden extrem niedrige Säurekonzentrationen verwendet. Im Zusammenhang mit diesen Bedingungen fanden Baugh und McCarty eine wichtige Reaktionseigenschaft der Säurehydrolyse: Der Abbau von Glucose zu unerwünschten Folgeprodukten erreicht bei pH 2,5 ein Minimum. Bei höheren pH-Werten steigt die Zersetzung wieder, was bedeutet, daß der Abbau nicht nur mit der Säurestärke zusammenhängt. Um einen pH-Wert um 2,5 zu erreichen, müssen sehr niedrige Säureniveaus von 0,05 - 1 % eingesetzt werden. In einem Rohrreaktor konnten mit 0,05 % Säurekonzentration Glucoseausbeuten von über 80 % aus reiner Cellulose erzielt werden.⁵³⁾

4.1.5 Hemicellulosenhydrolyse mit verdünnter Säure

Hemicellulose ist wesentlich leichter hydrolysierbar als Cellulose. Durch die heterogene chemische Zusammensetzung ist die Struktur der Hemicellulose offener als die der Cellulosefasern, so daß die Säure leichter eindringen kann. Auch durch den niedrigeren Polymerisationsgrad der Hemicellulose wird die Hydrolyse erleichtert.¹¹⁾ Weiters entsteht durch die Abspaltung der Acetylreste aus den Seitenketten der Hemicellulose Essigsäure, die ebenfalls zur Beschleunigung der Hydrolyse beiträgt.⁵⁸⁾

Die Hemicellulose weist allerdings nicht nur höhere Reaktionsgeschwindigkeiten für die Hydrolyse sondern auch für die Zersetzung der Hydrolyseprodukte auf. Abbildung 18 zeigt, daß die gebildete Xylose bei Reaktionstemperaturen von über 180 °C schon innerhalb einer Minute Reaktionszeit wieder abgebaut wird.⁸⁾

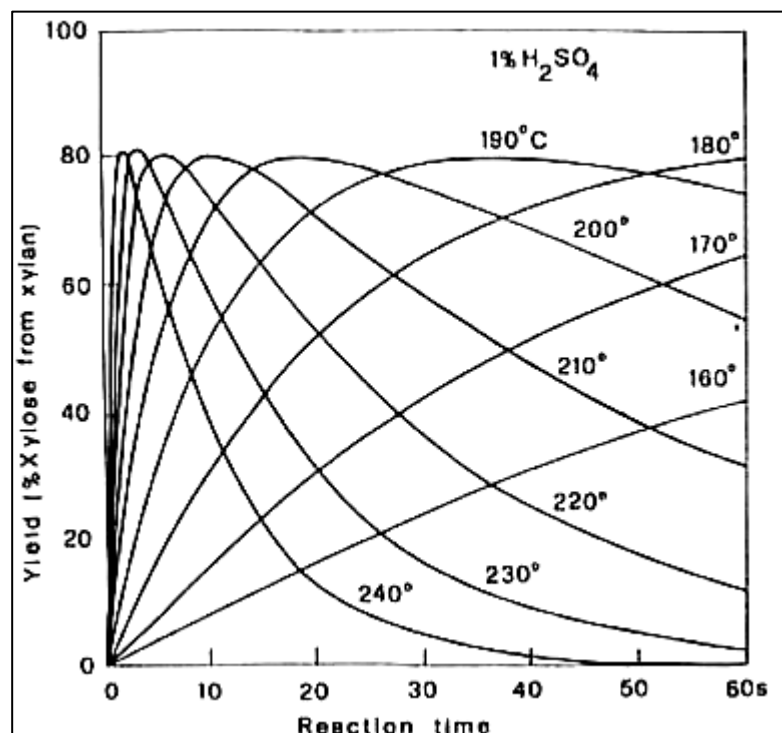


Abb. 18: Xyloseausbeute aus der Säurehydrolyse von Xylan als Funktion der Zeit und der Temperatur⁸⁾

Dies zeigt, daß eine Verzuckerung aller Polysaccharide in lignocellulärem Material in nur einem Hydrolyseschritt nicht zielführend ist. Sind die Bedingungen auf eine effektive Hydrolyse der Cellulose ausgerichtet, wird ein Großteil der schnell gebildeten Xylose bereits wieder abgebaut. Wird aber auf eine schonende Behandlung der Xylose geachtet, ist die Hydrolyse der Cellulose nicht mehr vollständig.

Daher ist für eine optimale Zuckerausbeute eine Hydrolyse in mindestens zwei Stufen zielführend.⁵⁸⁾ Im ersten Schritt wird die Hemicellulose gespalten und die aus ihr vorrangig entstehende Xylose abgetrennt. Dies geschieht meist mittels verdünnter Säure. Danach kann die Cellulose enzymatisch oder unter Säurekatalyse verzuckert werden. So können durch Anpassung der Reaktionsbedingungen an die Eigenschaften des jeweils zu hydrolysierenden Stoffes Zucker in größtmöglicher Ausbeute erhalten werden, was für eine Anwendung der Hydrolyse zur ökonomischen Verwertung von Maiseernterückständen unumgänglich ist.

Auch in Hinblick auf den Energieverbrauch des Prozesses ist eine zweistufige Hydrolyse vorteilhaft, da durch die vorherige Abtrennung der Hemicellulose die Masse an lignocellulärem Material, die bei höherer Temperatur behandelt werden muß, stark verringert wird.⁵⁴⁾

4.1.5.1 Kinetik der Hemicellulosenhydrolyse

Die Kinetik der Hemicellulosenhydrolyse kann für höhere Temperaturen (>160 °C) entsprechend der für Cellulose angenommen werden. Bei Temperaturen unter 160 °C kann die Hydrolyse von Hemicellulose allerdings nicht mehr als einfache Folge Reaktionen erster Ordnung betrachtet werden. Die Hemicellulose reagiert hier nicht mehr homogen. Es treten zwei Fraktionen auf: Eine, die schnell hydrolysiert wird, und eine zweite in der die Polysaccharide langsamer gespalten werden.^{53,54,56,45)} Beide können als parallele Reaktionen erster Ordnung beschrieben werden. Abbildung 19 (Seite 68) zeigt das Reaktionsmuster der Hydrolyse von Hemicellulose.

In der Anfangsphase der Reaktion werden die Hemicelluloseketten an willkürlichen Stellen von der Säure angegriffen. So entstehen Oligomere verschiedenen Polymerisationsgrades die dann weiter gespalten werden. Der Abbau kann über die monomeren Zuckern hinaus bis zu unerwünschten Folgeprodukten wie Furfural gehen.⁵³⁾

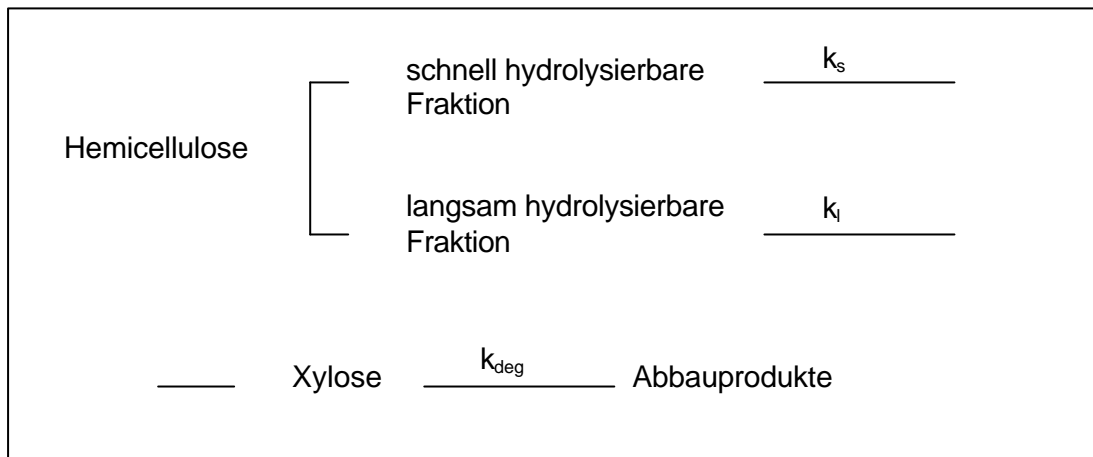


Abb. 19: Kinetisches Reaktionsmuster für die Hydrolyse von Hemicellulose⁴⁵⁾

Die Menge an noch vorhandenem schnell bzw. langsam reagierenden Hemicelluloseanteil kann durch folgende Gleichungen ausgedrückt werden:⁴⁵⁾

$$X_s = X_{s0} \cdot e^{-k_s \cdot t} \quad (2)$$

$$X_l = X_{l0} \cdot e^{-k_l \cdot t} \quad (3)$$

mit: X_s : Anteil an schnell reagierender Hemicellulose; X_l : Anteil an langsamer reagierender Hemicellulose; X_{s0} , X_{l0} : Ausgangskonzentrationen der beiden Hemicellulosefraktionen; k_s , k_l : Geschwindigkeitskonstanten; t : Zeit

Die gesamte zurückbleibende Hemicellulose (X_R) kann demnach nach

$$X_R = X_s + X_l = X_{s0} \cdot e^{-k_s \cdot t} + X_{l0} \cdot e^{-k_l \cdot t} \quad (4)$$

berechnet werden.

Die Geschwindigkeitskonstanten können nach der Arrheniusgleichung analog Gleichung 1 berechnet werden:

$$k = A_0 \cdot C^n \cdot e^{-E/R \cdot T} \quad (1)$$

mit: k : Geschwindigkeitskonstante; A_0 : präexponentieller Faktor; C : Säurekonzentration; n : Säureexponent; E : Aktivierungsenergie; R : $8,3143 \times 10^{-3}$ (kJ/mol · K); T : Temperatur

Für die Säurekonzentration ist die Neutralisationseigenschaft der Biomasse zu berücksichtigen.

Auch die Abbaureaktion für Xylose kann durch eine Reaktion erster Ordnung beschrieben werden. Die kinetischen Parameter für die Hydrolyse der Hemicellulose und Abbau der Xylose, die Esteghlalian et al.⁴⁵⁾ mit diesem Modell für Maisstover fanden, sind in den Tabellen 20 zusammengefaßt. Eken-Saracoglu et al.⁴⁶⁾ untersuchten die entsprechenden Werte für Maiskolben.

Tab. 20: Kinetische Parameter für die zweiphasige Hemicellulosenhydrolyse aus Maisstover und Maiskolben (Bezeichnungen wie in Gleichung 2 und 3)

		Maisstover⁴⁵⁾	Maiskolben⁴⁶⁾
X_{s0}		64,4 %	k.A.
X_{l0}		35,6 %	k.A..
	A_0	$6,7 \times 10^{16}$	$1,486 \times 10^{10}$
k_s	E (kJ/mol)	129,8	80,34
	n	1,5	1,21
	A_0	$6,9 \times 10^{19}$	$2,000 \times 10^{10}$
k_l	E (kJ/mol)	167,6	85,67
	n	1,6	1,86
	A_0	$3,7 \times 10^{10}$	$6,344 \times 10^{14}$
k_{deg}	E (kJ/mol)	99,5	133,7
	n	1,45	0,78

Mit Hilfe dieses Modells wurden für Maisstover bei Temperaturen zwischen 170 °C und 180 °C bei einer Säurekonzentration von 1 % und Reaktionszeiten zwischen 30 Sekunden und einer Minute eine Zuckerausbeute von 80 % des ursprünglichen Xylans vorhergesagt.

Bei Maiskolben ergeben die Berechnungen für 3 % Säurekonzentration und 130 °C nach ca. 15 Minuten Reaktionszeit einen Umsatz von 90 % des Xylans.

4.1.5.2 Reaktionsbedingungen

Maiskolben sind das in der Literatur überwiegend beschriebene **Substrat** zur Gewinnung xylosehaltiger Lösungen aus Maisbestandteilen, da ihr Xylananteil mit 28,4 %²²⁾ deutlich über dem von Maisstover (20,1 %) ²⁹⁾ liegt.

Die Maiskolben werden auf Partikeldurchmesser von 2-3 mm^{24,39)} gemahlen. Die gemahlene Kolben können vor der Hydrolyse mit warmem Wasser (60 °C) extrahiert werden, um lösliche Zucker, Salze und ähnliches zu entfernen²⁴⁾. Eine andere angewandte **Vorbereitungsmethode** ist die Lignin- und Acetylfentfernung mit Basen wie Ammoniak (hierzu siehe Kapitel 3.2.1.3). Auf diese Weise kann die Bildung von Essigsäure verhindert werden, die auf eine anschließende Fermentation des Hydrolysats mit Hefen inhibierend wirken würde.³⁹⁾

Die am häufigsten eingesetzte **Säure** ist Schwefelsäure aber auch Salzsäure findet Verwendung. Die eingesetzte Säurekonzentration liegt im verdünnten Bereich, um die Cellulose nicht zu hydrolysieren, die ja erst unter extremeren Bedingungen verzuckert wird. Der Trend geht in der Literatur zu immer geringeren Konzentrationen von 9 % im Jahr 1990²⁴⁾ über 2-3 % 1996 und 1997 bis zu unter ein Prozent 1999⁴⁴⁾. Je milder die Bedingungen während der Hydrolyse sind, desto geringer ist die Gefahr der Bildung unerwünschter Nebenprodukte wie Furfural.

Die gemahlene und eventuell vorbehandelte Biomasse wird in den Reaktor eingebracht. Ein **fest/flüssig Verhältnis** von unter 1:4 ist für Reaktionen ohne Rührung^{24,39)} üblich, wird gerührt liegt es bei 1:10.^{46,44)} Zur besseren Benetzung mit Säure wurde in einer Studie eine Einweichphase (15 min) vor die eigentliche Hydrolyse geschaltet, nach der die Säure wieder abgelassen (42 % Wiedergewinnung)²⁴⁾ und das fest/flüssig Verhältnis auf 3:7 erhöht wurde.

Die **Dauer und Temperatur** der Hydrolysereaktion stehen in engem Zusammenhang. Je höher die Temperatur um so kürzer muß die Reaktionszeit sein, um Cellulosehydrolyse und vor allem die Zersetzung der gebildeten Xylose zu minimieren. Bei höheren Temperaturen sind kürzere Reaktionszeiten aber auch durchaus ausreichend für gute Hydrolyseergebnisse. So sind für Xyloseausbeuten über 80 % bei Temperaturen um 100 °C Reaktionszeiten von 2 bis 3 Stunden, im Bereich um 140 °C bereits deutlich weniger als eine halbe Stunde und bei hohen Temperaturen ab 180 °C weniger als eine Minute nötig.^{24,39,44,45)}

4.1.5.3 Ausbeuten

Die Reaktionsbedingungen und Ausbeuten einiger in der Literatur beschriebener Hydrolysen von Hemicellulose sind in Tabelle 21 (Seite 72) zusammengefaßt.

Tab. 21: Reaktionsbedingungen und Ausbeuten für die Hemicellulosenhydrolyse von Maisernterückständen mit Säure

Pflanzenteil	Korngröße [mm]	Vorbehandlung	Verhältnis fest:flüssig	Säurekonzentration [%]	Temperatur [°C]	Zeit	Xyloseausbeute [g/kg TM (%)]	Xylangehalt [g/kg TM]	Literatur
Kolben	2	H ₂ O (60 °C)	3:7	9	100	3 h	200 (63)	318	24)
Kolben	3,2	Ammoniak	1:4	2	100	2 h	280 (85)	327	39)
Kolben	k.A.	/	1:10	~0,7	145	20 min	k.A.	k.A..	44)
Kolben	0,8-1,5	/	1:4	1	130	15 min	337 (90) ^{a)}	370	46)
Stover	k.A.	/	1:10	1	180	0,5-1 min	158 (80) ^{a)}	198	45)

^{a)} über Kinetikberechnung

4.1.6 Reaktoren und Prozesse für die Hydrolyse mit verdünnter Säure von Cellulose und Hemicellulose

Das Reaktordesign ist ein sehr wichtiger Punkt in der Hydrolyse mit verdünnter Säure. Erst durch die Entwicklung geeigneter Reaktoren konnten die Ausbeuten und Konzentrationen wesentlich verbessert werden, was den Einsatz der Säurehydrolyse auch zur Verzuckerung von Cellulose wieder interessant macht.

Diskontinuierlicher Rührkessel (Batchreaktor)

Batchreaktoren sind für die Säurehydrolyse von Cellulose nicht allzu gut geeignet. In einer Studie wurden bei 210 °C nur eine Ausbeute von 40 % erreicht.⁸⁾ Anwendungen bei wesentlich höheren Temperaturen würden zwar die Ausbeute erhöhen, sind aber wegen den Schwierigkeiten bei der Handhabung so kurzer Reaktionszeiten nicht durchführbar. Für die Hydrolyse von Hemicellulosen können in einem Batchreaktor allerdings Ausbeuten von 80-85 % erreicht werden. Aus diesem Grund wird dieser Reaktor oft zur Vorbehandlung vor der enzymatischen Hydrolyse verwendet.⁵³⁾

Rohrreaktor

Der Rohrreaktor ist ein Durchflußreaktor, durch den sich die flüssige und die feste Phase mit gleicher Geschwindigkeit bewegen. Im Rohrreaktor können höhere Temperaturen angewandt werden, weil die Reaktionszeit genauer kontrolliert werden kann. Im vorher beschriebenen Rohrreaktor mit Dampfeinspritzung konnten bei 240 °C und einer Aufenthaltszeit im Reaktor von 6 Sekunden Glucoseausbeuten von 55-58 % erzielt werden. Das aus dem Reaktor austretende Produkt ist eine Biomassesuspension oder feuchte Biomasse. Anschließend muß noch ein Trennungsschritt zwischen fester und flüssiger Phase folgen. Um möglichst hohe Zuckerkonzentrationen zu erzielen, muß das Material am Reaktoreingang möglichst dicht und wenig wasserhältig sein. Unter diesen Bedingungen ist der Weitertransport im Reaktor mittels Schnecken leichter durchführbar als mit externen Pumpen.

Mit dem Rohrreaktor können zwar 10 % höhere Ausbeuten erzielt werden als mit dem Batchreaktor, was aber dem Vergleich mit der enzymatischen Hydrolyse nicht standhält. Die Anwendung höherer Temperaturen zur etwaigen weiteren Steigerung der Ausbeute ist nicht möglich, da einerseits die Reaktionszeiten im Bereich von einigen Sekunden vor allem bei großen Reaktoren nicht mehr handhabbar sind, andererseits es zu Transportlimitationen in den Biomassepartikeln kommt. Es ist also zweifelhaft, daß der Rohrreaktor je zur Hydrolyse von Cellulose mit verdünnter Säure

geeignet sein wird. Für die Hydrolyse von Hemicellulose ist die Anwendung aber durchaus denkbar.⁵³⁾

Perkolationsreaktor

Der Perkolationsreaktor wird mit der Biomasse bepackt, und die Säure wird kontinuierlich durchgeleitet.

Der Perkolationsreaktor weist gegenüber dem Rührkessel und dem Rohrreaktor einige Vorteile auf. Erstens werden die Zucker gleich nach ihrer Bildung aus dem Reaktor entfernt, was deren Zersetzung deutlich reduziert. Zweitens kann die Hydrolyse mit einem höheren fest-flüssig Verhältnis durchgeführt werden, was die Zuckerkonzentration im Produktstrom erhöht. Drittens wird die flüssige Phase bereits beim Verlassen des Reaktors von der festen Phase getrennt, so daß keine anschließende Trennung wie nach einer Reaktion im Rührkessel oder Rohrreaktor nötig ist.⁵³⁾

Der Perkolationsreaktor liefert für die Hydrolyse von Cellulose ähnliche Ausbeuten wie der Rohrreaktor, die Ausbeuten und Zuckerkonzentrationen bei der Hemicellulosenhydrolyse lassen sich mit diesem Reaktor aber deutlich verbessern.

Chen et al.⁵⁹⁾ untersuchten mit Hilfe kinetischer Berechnungen die Hydrolyseergebnisse bei der Behandlung von Maistroh mit verdünnter Säure in Perkolationsreaktoren. Sie erforschten ein geeignetes Reaktordesign um der zweiphasigen Natur der Hemicellulose (siehe Kapitel 4.1.5.1) in den Hydrolysebedingungen gerecht zu werden.

Um die Bildung störender Nebenprodukte so gering wie möglich zu halten, verwendeten Chen et al. Reaktorsysteme, bei denen die langsamer hydrolysierende Fraktion der Hemicellulose und die schnell hydrolysierende unter den jeweils für sie geeignetsten Bedingungen behandelt wurden. Zwei Perkolationsreaktoren, die bei verschiedenen Temperaturen arbeiteten, wurden hintereinander geschaltet. So konnten die Reaktionstemperaturen so niedrig wie für die Hydrolyse der jeweiligen Hemicellulosefraktion möglich gehalten werden. Eine optimale Xyloseausbeute konnte bei Betriebstemperaturen von 140 °C und 170 °C für die beiden Reaktoren erzielt werden. Die Behandlung bei abgestufter Temperatur brachte eine Verbesserung von 8,8-9,0% in der Ausbeute an Xylose im Vergleich zu einem Verfahren, das nur bei der niedrigeren Temperatur durchgeführt wurde und 2,9-3,5% Verbesserung über ein Verfahren bei der höheren Temperatur erzielte.

Es wurden zwei Arten der Reaktorkombination erforscht. Einerseits wurde ein zweistufiges System, bei dem die Biomasse zuerst mit frischer Säure bei niedriger Temperatur und dann abermals mit frischer Säure bei hoher Temperatur behandelt wird, untersucht (siehe Abb. 20-A). Im zweiten Fall werden Biomasse und Säure im Gegenstrom durch die beiden Reaktoren geführt. Die bereits bei niedriger Temperatur behandelte Biomasse wird mit frischer Säure bei hoher Temperatur behandelt. Die flüssige Phase wird dann zur Behandlung von frischer Biomasse bei niedriger Temperatur verwendet (siehe Abb. 20-B).

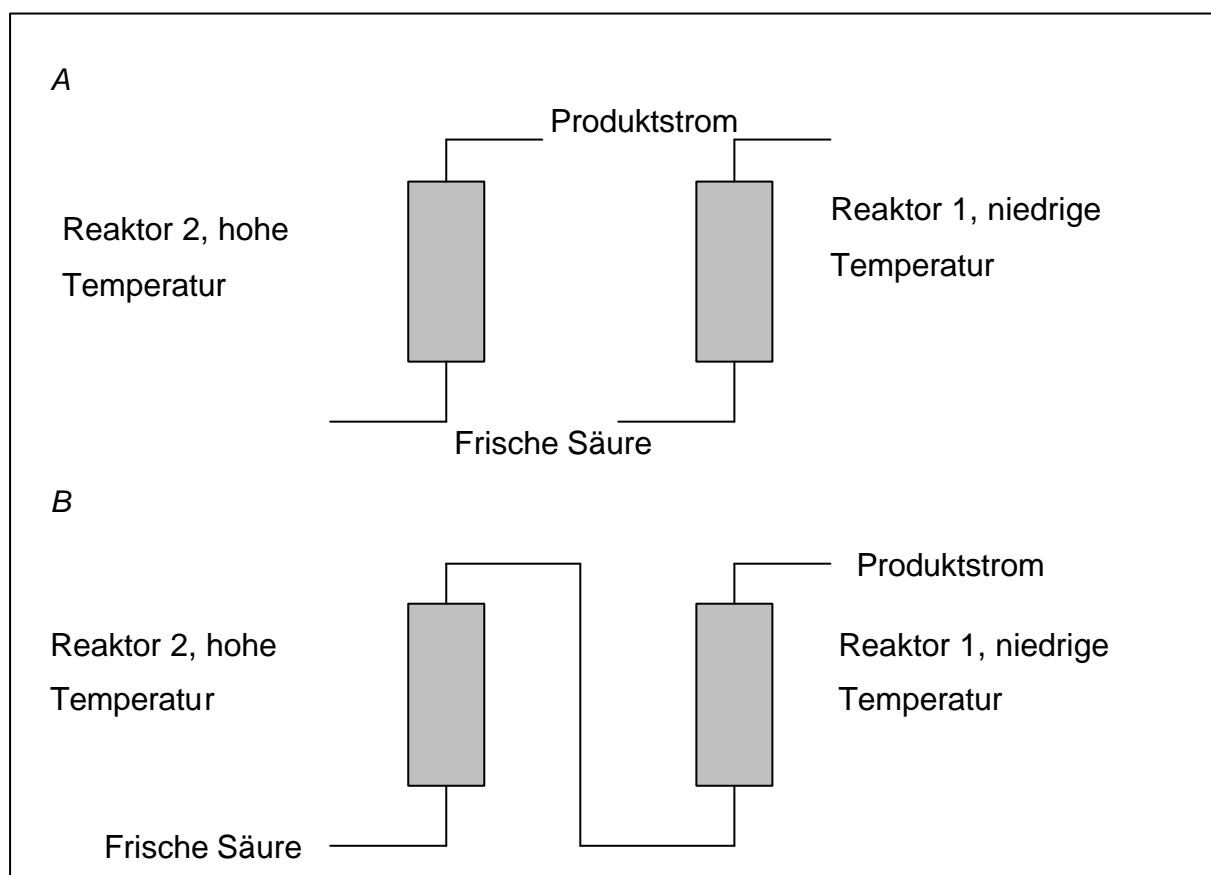


Abb. 20: Schema der Perkolationsreaktoren zur Hemicellulosenhydrolyse mit verdünnter Säure; A) Zwei-Stufen-Modell B) Zwei-Stufen-Modell mit Gegenstromprinzip ⁵⁹⁾

Im Zwei-Stufen-Prozeß ohne Gegenstromprinzip können etwas höhere Ausbeuten erzielt werden, dafür liefert der Prozeß mit Gegenstromprinzip höhere Zuckerkonzentrationen im Produktstrom. Nach dem von Chen et al. aufgestellten Kinetikmodell für Maiskolben/Stover-Mischung ist mit dem Zwei-Stufen-Reaktorsystem bei einer Säurekonzentration von 0,8 % eine Xyloseausbeute von über 98 % erreichbar (bei Produktstromkonzentrationen um etwas über 10 g/L), für

das Gegenstromprinzip können bei Ausbeuten von 98 % Konzentrationen von über 20 g/L bei Ausbeuten um 90 % sogar über 60 g/L erreicht werden.

Die selben Autoren modellierten auch noch die Verwendung eines Shrinking-bed-Reaktors, bei dem die Dichte der Biomasse im Reaktor durch eine bewegliche Wand des Reaktors immer konstant gehalten wird, auch wenn große Anteile gelöst werden. Durch diesen Reaktor können bei entsprechender Fließgeschwindigkeit hohe Konzentrationen und Ausbeuten gleichzeitig erzielt werden (ca. 97 % bei über 60 g/L Zucker).⁶⁰⁾

Gegenstrom Reaktor

Eine der neuesten Entwicklungen auf dem Gebiet der Säurehydrolyse ist die Verwendung eines Gegenstromreaktors. Es handelt sich um einen Fließbett-Reaktor, in dem die Bewegungsrichtung von Flüssigkeit und Feststoff entgegengesetzt ist. Für diesen Reaktortyp wurden ausgesprochen hohe Ausbeuten bei der Zuckerhydrolyse und auch hohe Zuckerkonzentrationen im Hydrolysat berechnet. Betrachtet man das Zuckerkonzentrationsprofil über die Reaktorlänge, zeigt sich, daß bei der Gegenstromvariante der Großteil der Zucker erst in der Nähe des Flüssigkeitsauslasses entsteht. So wird die Zeit, in der es zum Zuckerabbau kommen kann, möglichst gering gehalten, was die Ausbeute und die Konzentration erhöht.

Wright et al. simulierten solch einen Gegenstromreaktor, in dem sie eine Kaskade von sieben Perkolationsreaktoren verwendeten. Die beiden äußersten Reaktoren werden zur Befüllung bzw. Entleerung verwendet, zwei der mittleren zur Vorhydrolyse (für Hemicellulose), die drei anderen zur Haupthydrolyse. Nach einer bestimmten Betriebszeit der fünf mittleren Reaktoren wird ein Reaktor auf der Flüssigkeitseintrittsseite zur Entleerung abgekoppelt, auf der anderen Seite der Kaskade wird ein Reaktor mit frischer Biomasse dazugeschaltet. Durch Wiederholung dieses Vorgangs wird ein Gegenstrom simuliert indem die Reaktorinhalte in die eine Richtung wechseln und die Flüssigkeit entgegengeleitet wird.

Allerdings liefert dieser Reaktoraufbau nicht die erwarteten Ergebnisse. Einerseits werden bei der Hydrolyse ca. 80 % der Biomasse gelöst, das heißt der Leerraum in den Reaktoren steigt beträchtlich und das System weicht weit von den berechneten Idealbedingungen ab. Außerdem kann es zu Massen- und Energietransportlimitationen in den Biomasseteilchen kommen.

Torget et al. begegneten dem Problem der Volumsverringerung durch den Einsatz von Shrinking-Bed-Reaktoren. Diese besitzen an einem Ende des Reaktors eine bewegliche Wand, die über eine Feder dafür sorgt, daß die Biomassedichte konstant bleibt. Dieses Reaktormodell bewirkt eine Erhöhung der Ausbeute ohne gleichzeitig eine Erniedrigung der Zuckerkonzentration im Hydrolysat in Kauf nehmen zu müssen. Torget et al. verwendeten im Laborversuch diesen Reaktortyp in einer Kaskade von vier Reaktoren nach den oben beschriebenen simulierten Gegenstromprinzip (siehe Abb. 21) und konnten erstaunliche Ausbeuten sowohl für Cellulose (83% zu Glucose) als auch gleichzeitig für Hemicellulose (nahezu quantitativ zu Xylose) erzielen.

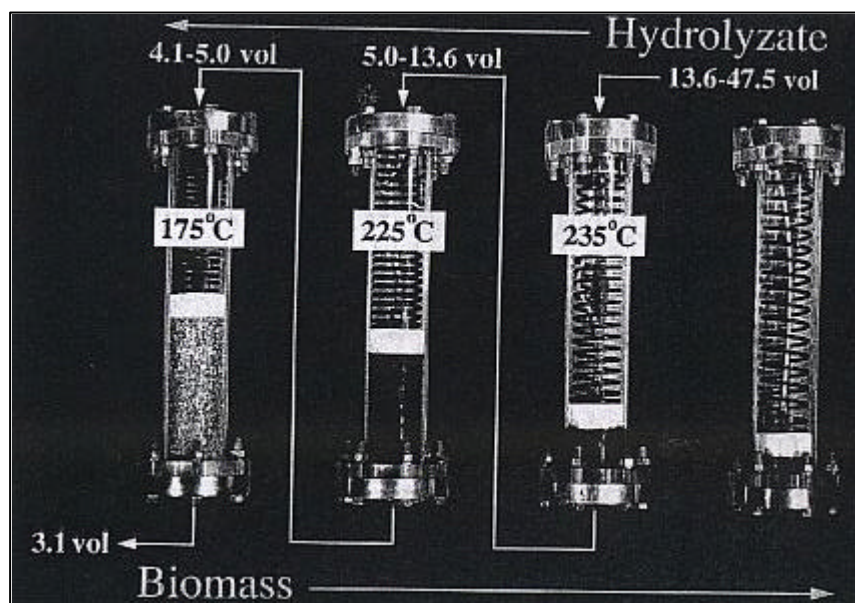


Abb. 21: Dreistufige Shrinking-bed-Gegenstromkaskade⁵³⁾

Ein wirklicher Gegenstromreaktor mit anpassbarem Reaktorvolumen ist derzeit noch auf theoretische Untersuchungen beschränkt, sollte aber noch bessere Ergebnisse liefern.

Die NREL (National Renewable Energy Laboratories) in den USA entwickelt gerade in Zusammenarbeit mit Sunds Inc., Norcross, GA, USA eine 200 kg/d kontinuierliche Gegenstrom-Pilotanlage mit zwei Reaktoren durch welche die Biomasse mit Schnecken bewegt wird, einer für die Vor- und einer für die Haupthydrolyse. Der Reaktor für die Vorhydrolyse ist als Rohreaktor konzipiert, der für die Haupthydrolyse als Gegenstromreaktor.⁵³⁾

Die besten erzielbaren Zuckerausbeuten der Säurehydrolyse von Cellulose liegen mit den beschriebenen Reaktoren also bei etwa 80 % der theoretisch möglichen, die enzymatische Hydrolyse liefert um 90 % Ausbeute. Für die Anzucht der Enzyme

werden dort allerdings auch circa 9% der insgesamt eingesetzten Biomasse gebraucht, so liegen die Gesamtausbeuten letztlich im Idealfall ungefähr gleich hoch.

Für die Hydrolyse von Cellulose scheinen neue Reaktorendesigns also vielversprechende, mit der enzymatischen Hydrolyse konkurrenzfähige Ausbeuten zu liefern, es ist aber noch ein weiter Weg von den theoretischen Konzepten bis zur industriellen Anwendung zu bewältigen.

4.1.7 Toxizität des Hydrolysats

Die rohe Zuckerlösung aus einem Säurehydrolyseprozeß enthält verschiedenste Abbauprodukte. Einerseits handelt es sich um niedermolekulare Lignintteile, das sogenannte säurelösliche Lignin, andererseits um Abbauprodukte der Zucker wie Furfural, Hydroxymethylfurfural, Ameisensäure und Essigsäure. Die meisten dieser Stoffe sind toxisch für Mikroorganismen und stören bei einer nachfolgenden Fermentation.⁵³⁾

Das Hydrolysat muß nach der Reaktion neutralisiert werden, was zum Beispiel mit Natronlauge oder Calciumcarbonat³⁹⁾ geschehen kann. Auch eine Filtration ist oft notwendig. Um eine Inhibierung der Mikroorganismen in einer folgenden Fermentationen durch toxische Nebenprodukte zu vermeiden, kann einerseits das Lignin schon vor der Hydrolyse durch Behandlung mit Basen abgetrennt werden und andererseits nach der Hydrolyse eine ionenchromatographische Reinigung zur Entfernung von Salzen und geladenen Abbauprodukten erfolgen.^{24,39)} Auch eine Reinigung mit Aktivkohle zur Entfärbung kann durchgeführt werden.⁶¹⁾

Welche Maßnahmen zur Entfernung oder Vermeidung der toxischen Nebenprodukte auch immer getroffen werden, die jeweilige Behandlung bringt kostenmäßig einen Nachteil für die Hydrolyse mit Säure im Vergleich zur enzymatischen Hydrolyse.

4.2 Enzymatische Hydrolyse

4.2.1 Vor- und Nachteile einer enzymatischen Hydrolyse

Die Vorteile biologischer Prozesse, also auch der enzymatischen Hydrolyse, im Vergleich zu chemischen sind:¹⁷⁾

- höhere Ausbeuten der gewünschten Produkte
- keine toxischen Nebenprodukte
- größere Substratspezifität und Reaktionsspezifität
- geringerer Energieaufwand nötig
- geringeres Risiko der Umweltverschmutzung
- Möglichkeiten zu Umsetzungen, die auf chemischem Weg nicht möglich sind

Der Hauptvorteil der enzymatischen Hydrolyse liegt also in den hohen Ausbeuten. Cellulaseenzyme katalysieren spezifisch die Hydrolyse-reaktion, daher kann es nicht zum Abbau der gebildeten Zucker kommen. So werden auch toxische Nebenprodukte vollständig vermieden.

Nachteilig wirken sich allerdings die geringe Umsatzgeschwindigkeit, der hohe Kostenaufwand für die Enzyme, der erhöhte Aufwand bei der Vorbehandlung und die geringen Produktkonzentrationen aus.⁸⁾

4.2.2 Systematisierung und Wirkungsweise der Cellulasen

4.2.2.1 Systematisierung von Cellulasen

Cellulolytische Enzyme werden in drei große Gruppen unterteilt. Ein vollständiges enzymatisches Cellulase-System, das Cellulose bis zur Glucose spalten kann, setzt sich zumindest aus Enzymen dieser drei Gruppen zusammen^{8,62,63,40}:

- endo- β -1,4-Glucanase (EC 3,2,1,4)
- exo- β -1,4-Glucanase (EC 3,2,1,91) (= Cellobiohydrolase)
- β -Glucosidase (EC 3,2,1,21) (= Cellobiase)

Solche enzymatischen Systeme wurden in vielen mesophilen und thermophilen Pilzen, mesophilen und thermophilen Bakterien und einigen Actinomyceten gefunden.

Am besten untersucht und am häufigsten eingesetzt ist das Cellulase-System des Pilzes *Trichoderma reesei* (früher *Trichoderma viride* genannt).⁸ Es besteht aus vier Endoglucanasen, zwei Cellobiohydrolasen und einer β -Glucosidase. In Tabelle 22 sind die Reaktionen der Enzyme und ihre Inhibitionen zusammengefasst.⁴⁰

Tab 22: Reaktionen der cellulolytischen Enzyme⁴⁰

Enzym	Reaktionsfolge
Cellobiohydrolase Inhibition Inhibition	$E_1 + G_x \leftrightarrow E_1 G_x \rightarrow E_1 G_2 G_x \rightarrow E_1 + G_2 + G_x$ $E_1 + G_2 \leftrightarrow E_1 G_2$ $E_1 + G \leftrightarrow E_1 G$
Endoglucanase Inhibition	$E_x + G_x \leftrightarrow E_x G_x \rightarrow E_x 2G_x \rightarrow E_x + 2G_x$ $E_x + G \leftrightarrow E_x G$
β -Glucosidase Nicht-kompetitive Inhibition Kompetitive Inhibition	$E + G_2 \leftrightarrow E G_2 \rightarrow E + 2G$ $E G_2 + G \leftrightarrow E G_2 G$ $E + G \leftrightarrow E G$

Die drei Enzyme arbeiten nach heutiger Auffassung konzertiert am Abbau der Cellulose zu Glucose. Endo- β -1,4-Glucanase spaltet die Cellulose willkürlich im Inneren der Kette, um neue Enden zu schaffen. Sie schneidet vor allem in weniger kristallinen Abschnitten. Exoglucanasen spalten Cellobioseeinheiten (β -1,4-Glucosedimere) von den Enden der Celluloseketten ab.⁴⁰ Je nach Art der Cellobiohydrolasen geschieht dies vom nicht reduzierenden oder vom reduzierenden Ende aus.⁶² Die β -Glucosidase spaltet die Cellobiose und in einigen Fällen auch

andere Oligosaccharide in Glucoseeinheiten. Dieses Enzym ist hauptverantwortlich für die kinetische Regulation des ganzen cellulolytischen Prozesses. Es ist der geschwindigkeitsbestimmende Faktor, besonders weil Endoglucanase und Cellobiohydrolase durch Cellobiose gehemmt werden. β -Glucosidase produziert also nicht nur Glucose aus Cellobiose sondern reduziert auch die Inhibition durch Cellobiose.

4.2.2.2 Chemischer Mechanismus der enzymatischen Hydrolyse mit Cellulasen

Cellulolytische Enzyme hydrolysieren glycosidische Bindungen über den Mechanismus der Säurehydrolyse. Zwei Aminosäuren, ein Protonendonator und ein Nucleophil werden hierfür benötigt. In den meisten Fällen sind dies Glutaminsäure und Asparaginsäure.

Eine Herabsetzung der Energiebarriere für die Reaktion wird außer durch die Nähe eines geeigneten Protonendonors und eines Nucleophils auch durch die räumliche Verzerrung des Substrats, durch die Bindung an das Enzym und durch die Stabilisierung des chemischen Zwischenprodukts der Reaktion erreicht.

Bei Glycosylhydrolasen treten zwei verschiedene Mechanismen der Hydrolyse auf. Bei der einen Art wird die geladene Umgebung des Reaktionszentrums dazu genutzt, ein Wassermolekül zu aktivieren. Dieses dient als Nucleophil, während ein saurer Aminosäurerest das benötigte Proton liefert (siehe Abb. 22). Dies wird „invertierender Mechanismus“ (inverting mechanism) genannt, weil die Protonierung der katalytisch wirkenden Aminosäuren nach einer durchgeführten Hydrolyse räumlich vertauscht vorliegt.

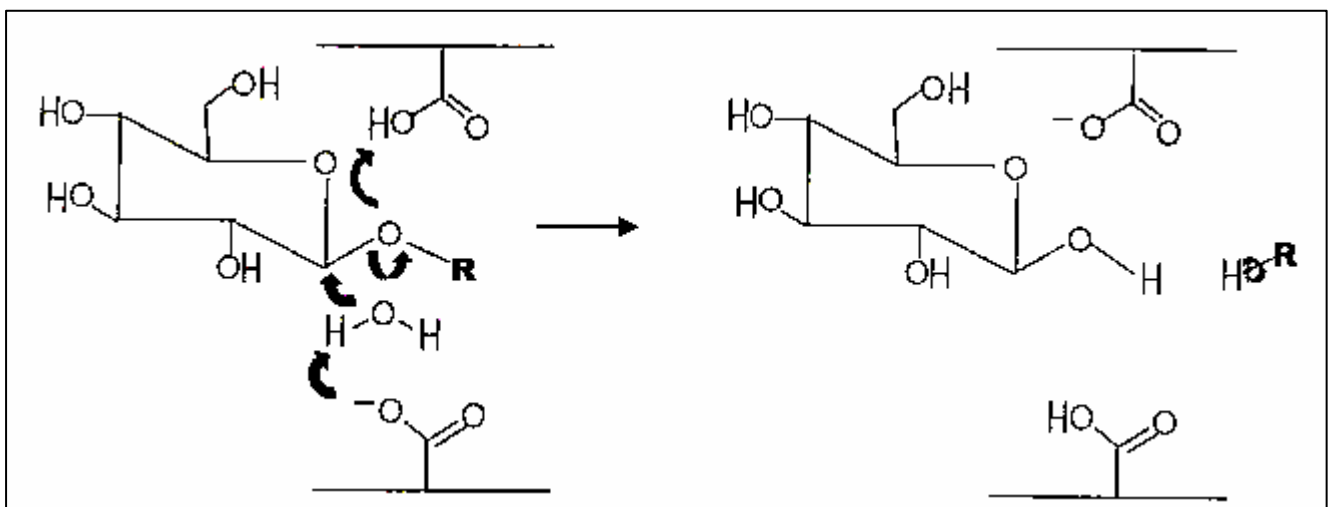


Abb. 22: „invertierender Mechanismus“ der enzymatischen Cellulosehydrolyse⁶²⁾

Der zweite Mechanismus, der „beibehaltende Mechanismus“ (retaining mechanism) (siehe Abb. 23), läuft über ein kovalent gebundenes Zwischenprodukt, das durch einen nucleophilen Angriff des geladenen Aminosäurerests auf die glycosidische Bindung gebildet wird. In einem zweiten Schritt wird ein Wassermolekül für den nucleophilen Angriff aktiviert. Durch diesen wird das Hydrolyseprodukt vom Enzym getrennt und der Protonendonator wieder protoniert.

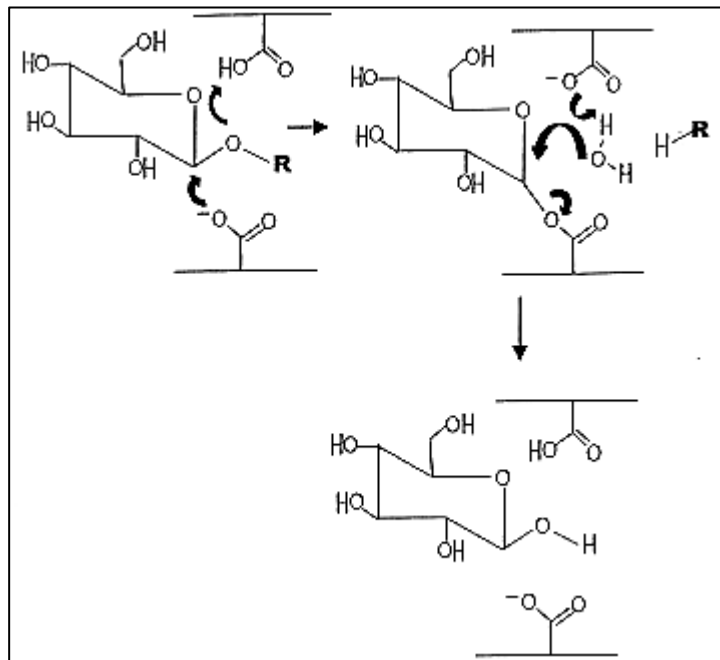


Abb. 23: „beibehaltender Mechanismus“ der enzymatischen Cellulosehydrolyse⁶²⁾

Der Hauptunterschied zwischen den beiden Mechanismen besteht im Abstand zwischen den beiden Aminosäuren. Dieser beträgt für den beibehaltende Mechanismus 4,8 – 5,3 Angström, für den invertierenden 9,0 bis 9,5 Angström. Wahrscheinlich ist beim letzteren der größere Abstand notwendig, weil hier sowohl das Substrat als auch das Wasser zwischen den beiden Carboxylgruppen der Aminosäuren Platz finden müssen.

Es wurden cellulolytische Enzyme beider Typs gefunden. Cellobiohydrolase I, das Hauptenzym des Cellulasesystems aus *Trichoderma reesei*, ist ein Enzym mit beibehaltendem Mechanismus.⁶²⁾

4.2.3 Hemicellulasen

Hemicellulasen bewirken die spezifische Hydrolyse von Hemicellulose. Zu dieser Gruppe gehört unter anderem die endo- β -1,4-D-Xylanase (EC 3.2.1.8), die die Hydrolyse der β -1,4-glycosidischen Bindungen innerhalb eines Xylosepolymers bewirkt. Die entstandene Xylanbiose kann durch die β -Xylosidase (EC 3.2.1.37) zu Xylosemonomeren hydrolysiert werden. Die α -Arabinosidase (EC 3.2.1.55) katalysiert die Hydrolyse von endständigen α -Arabinofuranose-Gruppen aus Arabinoxylan und Arabinogalactan. Um Acetylesterguppen vom Xylan abzuspalten sind Acetylerasen (EC 3.1.1.6) als Katalysatoren erforderlich. α -D-Glucuronidasen sind notwendig, um die α -1,2-glykosidischen Bindungen der D-Glucuronsäure bzw. 4-O-Methylglucuronsäure zu Xylose zu spalten.¹³⁾

Auftrennung durch Gelpermeation und Ionenchromatographie ergaben, daß mindestens 15 verschieden Enzyme dem Xylanasekomplex angehören. Das Molekulargewicht dieser Proteine liegt zwischen 17000 und 50000 Dalton.

Die Hydrolyse von Hemicellulosen durch Xylanase und β -Xylosidase aus *Trichoderma reesei* wurde untersucht. Das Temperaturoptimum lag für beide Enzyme bei 55-60 °C und das pH-Optimum bei 4-5. Die Xylanase wurde bei 65 °C innerhalb einer Stunde Reaktionszeit völlig deaktiviert.¹²⁾

Eine Abtrennung der Hemicellulose mittels enzymatischer Hydrolyse scheint allerdings bei Studien zur Zuckergewinnung aus lignocellulärem Material nicht üblich zu sein, es konnten keine Unterlagen bezüglich Zuckergewinnung durch spezifische enzymatische Hydrolyse der Hemicellulose aus Mais gefunden werden. Die weiteren Kapitel zur enzymatischen Hydrolyse beziehen sich daher auf die Hydrolyse von Cellulose.

Interesse am Einsatz von Xylanase zur Gewinnung reiner Cellulose zeigt allerdings die Papierindustrie.³⁶⁾

4.2.4 Einsatzmöglichkeiten der Enzyme in der Cellulosehydrolyse

Der Einsatz von Enzymen zur Hydrolyse der Cellulose kann auf zwei Arten geschehen.

Einerseits kann das Substrat mit Mikroorganismen inkubiert werden, die Cellulasesysteme bilden und so im Zuge ihres Wachstums die Cellulose abbauen. Allerdings müssen dabei aber für das Wachstum der Mikroorganismen geeignete Bedingungen bereitgestellt werden (z.B. Medium, Sterilität). Außerdem verbrauchen die Mikroorganismen zu einem gewissen Teil die durch die Hydrolyse erhaltenen Zucker selbst.

Meist werden zum Celluloseabbau fähige Mikroorganismen daher in einer eigenen Fermentation angezüchtet und die extrazellulären Cellulaseenzyme dann abgetrennt.²⁾ Die Cellulase kann bei verschiedenen Anbietern käuflich erworben oder aus Kostensparnisgründen vom Verbraucher selbst in einem getrennten Prozeßschritt fermentiert werden. In diesem Fall kann die nur grob von der Biomasse getrennte Enzymlösung ohne weitreichende Aufreinigung zur Hydrolyse des lignocellulären Materials eingesetzt werden.

4.2.5 Prozeßparameter der Cellulosehydrolyse

Verschiedene Faktoren beeinflussen die Hydrolyse von cellulärem Material. Diese umfassen:

- Art des Substrats
- Vorbehandlung
- Enzymcharakteristiken
- Reaktionsparameter (Temperatur, Zeit, pH-Wert, Konzentrationen)
- Wiederverwendung des Enzyms
- Reaktortyp
- Zusatz von Tween (Polyethoxysorbitanester)

Viele dieser Faktoren sind voneinander abhängig, was die Optimierung des gesamten Prozesses sehr schwierig macht, besonders in Hinblick auf die ökonomische Sinnhaftigkeit.

So lassen die hohen Enzymkosten keine hohen Enzymkonzentrationen zu, bei niedriger Enzymbeladung werden aber sehr lange Reaktionszeiten nötig, was wieder die Rentabilität herabsetzt. Ebenso darf die Reaktionstemperatur bei

Wiederverwendung des Enzyms nicht hoch sein, bei diesen niedrigen Temperaturen wird aber die Reaktion wieder sehr langsam.

Im Idealfall wäre die Reaktion schnell und vollständig, würde zu einer hohen Glucosekonzentration führen, ohne daß das Enzym deaktiviert würde. Dieses könnte dann wiederverwendet werden.⁵²⁾

4.2.5.1 Maisernterückstände als Substrat für enzymatische Hydrolyse

Die Gehalte an Glucan und Xylan und die Hydrolyseergebnisse für Maisstroh liegen in der selben Größenordnung wie die anderer Lignocellulosen. Ein Grund, der für die Verwendung von Maisstroh spricht, ist die große zur Verfügung stehende Menge dieses Substrats und die daher zu erwartenden geringen Kosten. Auch die bereits erwähnte (siehe Seite 18) grobporige Struktur des Maisstrohs, die sehr aufwendiges Mahlen unnötig macht, ist günstig.

4.2.5.2 Vorbehandlung der Biomasse

Die äußerst große Bedeutung der Vorbehandlung für möglichst hohe Umsätze durch enzymatische Hydrolyse wurden bereits deutlich hervorgehoben. Im Zuge der Hydrolyse müssen Enzyme an die Cellulose adsorbieren, wozu eine genügend große, frei zugängliche Oberfläche vorhanden sein muß. Eine entsprechende Auflockerung der kompakten Struktur, die durch die Aneinanderlagerung von Cellulose, Hemicellulose und Lignin entsteht, ist so unumgänglich. Die verschiedenen Vorbehandlungsmethoden wurden bereits in Kapitel 3 eingehend erläutert.

Cellulasen treten meist gemeinsam mit Hemicellulasen auf, da viele Mikroorganismen beide Enzyme produzieren und diese nicht leicht zu trennen sind.²⁾ So können aus lignocellulärem Material durch enzymatische Hydrolyse Hexosen und Pentosen gleichzeitig gewonnen werden. Trotzdem ist eine vorherige Abtrennung der Hemicellulose empfehlenswert. Es besteht zwar bei gemeinsamer Hydrolyse im Gegensatz zur Hydrolyse mit Säure nicht die Gefahr der Bildung toxischer Nebenprodukte, aber einerseits wird durch eine gezielte Abtrennung die Hydrolyserate sowohl für Hemicellulose als auch für Cellulose erhöht, andererseits ist im Hinblick auf die Weiterverwendung der Zuckerlösung ein getrennter Anfall von Pentosen und Hexosen günstiger als ein Gemisch aus beiden. So sind zum Beispiel wenige Mikroorganismen fähig, sowohl Hexosen als auch Pentosen im gleichen

Ausmaß als Substrat zu verwenden. Auch für eine nicht-fermentative Weiterverarbeitung der Zucker sind reine Produkte meist vorteilhaft.

Die Abtrennungsmethoden für Hemicellulosen wie die vorwiegend eingesetzte Hydrolyse mit verdünnter Säure wurden bereits beschrieben.

4.2.5.3 Enzymcharakteristik

Produktinhibierung, thermische Deaktivierung, Substratinhibierung, geringe Produktausbeuten und hohe Enzymkosten sind Hindernisse hinsichtlich einer ökonomischen Anwendung der enzymatischen Hydrolyse. Verbesserungen in der Wirtschaftlichkeit der enzymatischen Hydrolyse wären durch Enzyme mit den Anforderungen angepaßten Charakteristiken zu erzielen. Besonders eine erhöhte Thermostabilität und Substrat- und Produkttoleranzen wären günstige Eigenschaften.

Obwohl viele Mikroorganismen cellulolytisch aktiv sind, wurden bisher hauptsächlich die Enzyme zweier Pilzstämme, *Trichoderma* und *Aspergillus*, intensiv untersucht und angewendet. Weitere Enzyme mit ähnlichen oder besseren Eigenschaften könnten durch vermehrtes Screening von cellulolytischen Mikroorganismen gefunden werden, andererseits besteht auch die Möglichkeit der Veränderung von bereits erprobten Enzymen durch den Einsatz gentechnologischer Methoden.⁴⁰⁾

4.2.5.4 Reaktionsparameter

Hauptsächlich wird das Cellulasesystems des Pilzes *Trichoderma reesei* zur enzymatischen Hydrolyse verwendet. Die in Tabelle 21, Seite 91 zusammengefaßten in der Literatur gefundenen Anwendungen wurden durchwegs im Schüttelkolben durchgeführt.

Das **Temperaturoptimum** dieser Enzyme liegt zwischen 45 und 50 °C, manchmal wird die Hydrolyse auch bei Temperaturen um 40 °C durchgeführt.

Der optimale **pH-Wert** liegt bei 4,8, was dem pH-Wert eines 0,05 molaren Zitratpuffers entspricht.

Die **Substratkonzentration** liegt meist zwischen 2,5 Gew.% und 5 Gew.%, die **Rührergeschwindigkeit** bei 100-150 rpm.

Sowohl **Enzymbeladung** als auch **Reaktionszeit** differieren stark in der Literatur. Je höher die Enzymbeladung um so geringere Reaktionszeiten sind für die selbe Ausbeute nötig. Die Reaktionszeit liegt großteils bei 2 bis 3 Tagen. Ein Überblick über die Bandbreite der Enzymbeladungen gibt Tabelle 23, Seite 91.

4.2.5.5 Wiederverwendung der Enzyme

Durch Rückführung der Enzyme kann die eingesetzte Menge frischen Enzyms reduziert und so die Kosten verringert werden. Physikalische Trennmethode wie Ultrafiltration sind aufgrund der hohen Kosten nicht einsetzbar. Die vielversprechendste Technik macht sich die hohe Affinität der endo- und exo-Glucanasen der Cellulasen zu Cellulose zunutze. Am Ende der Hydrolyse werden diese Enzyme dann wieder freigesetzt. Bringt man die Reaktionsflüssigkeit in einem Gegenstromprinzip mit frischem Substrat in Kontakt, kann ein Teil der bereits verwendeten Enzyme an dieses binden und so erneut die Hydrolyse katalysieren. β -Glucosidase, die zum Großteil nicht an das Substrat bindet, muß allerdings zusätzlich zugeführt werden. Eine Immobilisierung der β -Glucosidase könnte die benötigte Menge verringern.

Ein Teil der Enzyme degradiert auch während der Hydrolyse, ein anderer bindet irreversibel an Lignin oder nicht hydrolysierte Cellulose.⁸⁾ Aufgrund dieser Probleme scheint bereits eine Wiederverwendung von 50 % der Enzyme sehr optimistisch. Die Rückführung der Enzyme birgt außerdem ein erhöhtes Infektionsrisiko. Wird auf eine Weiterverwendung verzichtet, könnte die Reaktionstemperatur eventuell auf 55 °C gesteigert und so die Reaktionszeit verkürzt werden.⁵²⁾

4.2.5.6 Reaktoren

Das Reaktordesign ist von großer Wichtigkeit für die enzymatische Hydrolyse. Drei Reaktortypen sind normalerweise im Gebrauch: Der diskontinuierliche Rührkessel, der am häufigsten angewandt wird, der kontinuierliche Rührkessel mit einer Ultrafiltrationsmembran und der Rohrreaktor.

Drei Faktoren, die Cellulosekonversionsrate, die erreichbare Konzentration und die Produktivität, sollen hier für den diskontinuierlichen Rührkessel und den Rohrreaktor kurz betrachtet werden.

Die Cellulosekonzentration ist im Rührkessel geringer als im Rohrreaktor, der mit einer höheren Substratkonzentration betrieben wird. Die geringere Substrat-

konzentration führt aber zu einer besseren Umsatzrate für Cellulose. Je höher allerdings die Enzymbeladung wird, um so kleiner wird der Unterschied zu den Ergebnissen des Rohrreaktors. Dies ist darauf zurückzuführen, daß beim Rohrreaktor das Produkt laufend aus dem Reaktor entfernt wird und so Inhibitionen, die durch die höheren Zuckerkonzentrationen bei höheren Enzymkonzentrationen entstehen, eine geringere Rolle spielen als im Rührkessel.

Auch die Zeit ist ein wichtiger Parameter. Im Rührkessel erfolgt die Cellulosekonversion zu Beginn wesentlich schneller, allerdings flacht der Verlauf der Umsatzgeschwindigkeit dann ab (siehe Abb. 24) Der Rohrreaktor weist eine eher konstante Umsatzgeschwindigkeit auf, so daß ab einer gewissen Reaktionszeit seine Umsatzraten über denen des Rührkessels liegen.

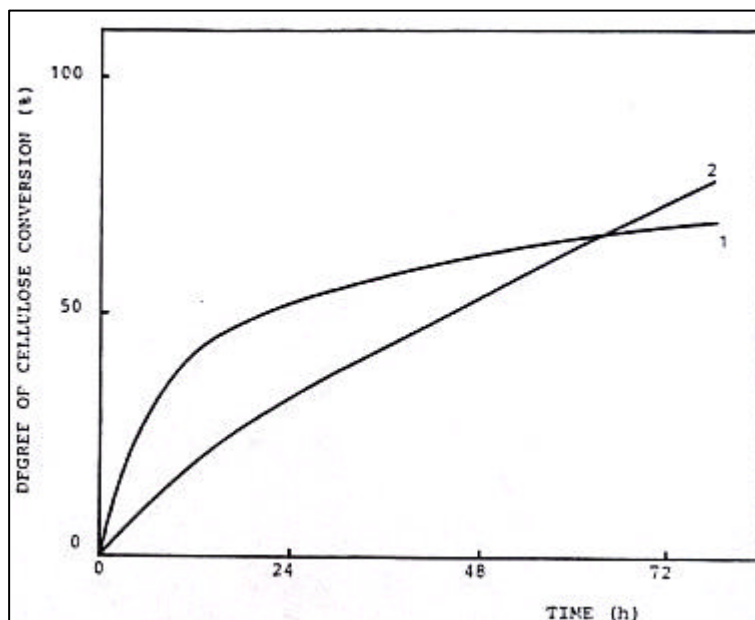


Abb. 24: zeitlicher Verlauf der Celluloseumwandlungsrate von Rührkessel und Rohrreaktor⁶⁴⁾

Die Produktkonzentration ist für den Rührkessel allgemein höher, da die Zucker bis zum Ende der Hydrolyse im Reaktor verbleiben. Beim Rohrreaktor muß für hohe Produktkonzentrationen die Flußrate gering gehalten werden. So können die Konzentrationen des Rührkessels erreicht oder sogar überschritten werden. Allerdings ist zu beachten, daß es durch die erhöhte Konzentration an Produkten verstärkt zu Inhibitionen kommt. Eine geringere Flußrate sorgt also zwar einerseits für eine erhöhte Zuckerkonzentration, andererseits wird aber die Umwandlungsrate für die Cellulose herabgesetzt.

In Bezug auf die Produktivität ist der Rohrreaktor dem Rührkessel immer überlegen. Die Gründe dafür sind folgende: Einerseits ist die Cellulosekonzentration im Rohrreaktor wesentlich höher, andererseits wird der inhibierende Einfluß der Produkte reduziert. Die Produktivität des Rohrreaktors wird durch höhere Flußraten vergrößert.⁶⁴⁾

Welcher Reaktortyp die besten Ergebnisse für die enzymatische Hydrolyse liefert, hängt also von den jeweiligen Reaktionsbedingungen und deren Optimierung ab.

4.2.5.7 Zusatz von Tween

Da Enzyme einen wesentlichen Kostenfaktor bei der enzymatischen Hydrolyse darstellen, müssen Maßnahmen, die den Einsatz derselben minimieren, angestrebt werden.

In diesem Zusammenhang wurde der Zusatz von nicht-ionischen oberflächenaktiven Substanzen empfohlen. Zu diesen gehören Tween 20 (Polyethoxysorbitanmonolaurat, CAS # 9005-64-5) und Tween 80 (Polyethoxysorbitanmonooleat, CAS # 9005-65-6).

Diese Stoffe erhöhen die Aktivität der Cellulase und stabilisieren das Enzym. Sie tragen zu einer besseren Wiederverwendbarkeit der Enzyme bei, indem sie einerseits die Desorption von der Cellulose erleichtern und andererseits die Temperaturreistenz der Enzyme erhöhen.

Kaar et al.²⁷⁾ geben als optimale Tweenmenge für die enzymatische Hydrolyse 0,15 g/g trockene Biomasse an. Wie in Abb. 25 (Seite 90) zu sehen ist, ist Tween 20 in der Steigerung der Polysaccharidspaltung etwas effektiver als Tween 80. Bei der empfohlenen Tweenkonzentration und einer Enzymkonzentration von 5 FPU/g trockene Biomasse bei 50 °C und 72 h Reaktionszeit kann Tween 80 den Glucanumsatz um 36 % und den Xylanumsatz um 18 % steigern, mit Tween 20 erhöhen sich die Umsätze um 41,7 % bzw. 40,4 %.

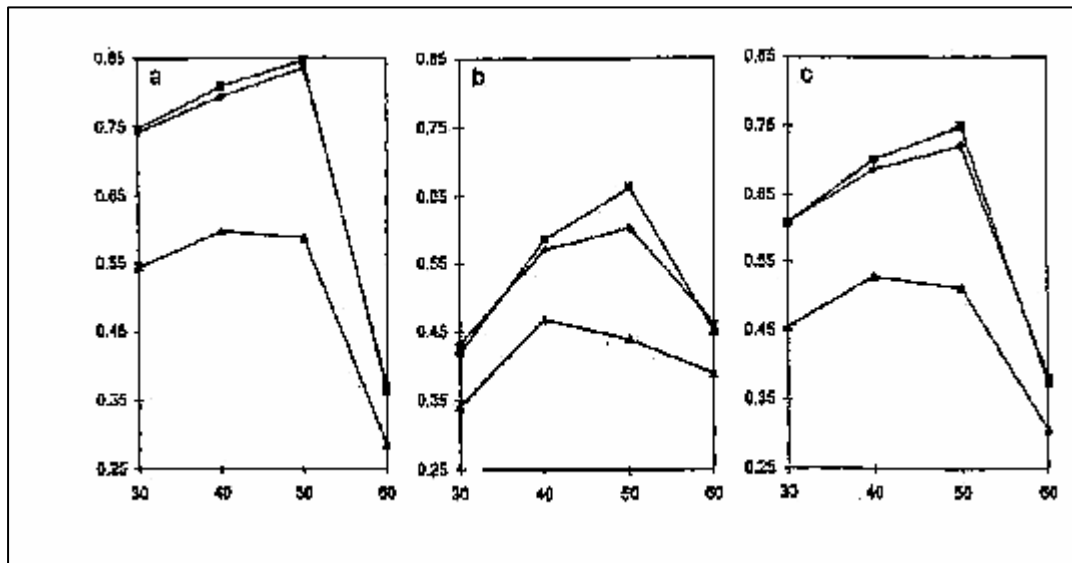


Abb. 25: Umwandlung von Glucan (a) und Xylan (b) bei verschiedenen Hydrolyse-temperaturen unter Verwendung von 5 FPU Cellulase/g Biomasse und 72 h Reaktionszeit. Legende: oberste Linie: 0,15 g Tween 20/g tr. Biomasse; mittlere L.: 0,15 g Tween 80/g tr. Biomasse; unterste L.: kein Tween

4.2.5.8 Ausbeuten

Die meisten in der Literatur gefundenen Angaben über enzymatische Hydrolyse von Maisrückständen beziehen sich auf Versuche im Labormaßstab. Eine Zusammenschau der Hydrolyseergebnisse aus der Literatur mit den jeweiligen Vorbehandlungs- und Hydrolysebedingungen findet sich in Tabelle 23.

Glucoseausbeuten von teilweise weit über 90 % bezogen auf den Glucangehalt scheinen sowohl für Kolben als auch Stover möglich zu sein. Allerdings erreichen viele Forscher diese Werte nicht. Der Einsatz von optimalen Vorbehandlungs- und Hydrolysebedingungen ist für hohe Ausbeuten daher unbedingt notwendig.

Die bisher erzielten Ergebnisse scheinen aber durchaus weitere Forschung und Entwicklung zu befürworten, um letztlich die enzymatische Hydrolyse in größerem Maßstab durchführen zu können.

Tab. 23-a: Zusammenschau der Ergebnisse enzymatischer Hydrolysen von Maisernterückständen mit verschiedenen Vorbehandlungsmethoden

Maisteil	Korngröße	Vorbehandlung		enzymatische Hydrolyse		Hydrolyserate	Lit.
		Methode	Parameter	Enzym	Parameter		
Stover	1-2mm	NaOH	0,32g NaOH/g Stover, 1) 6h bei RT 2) dann 1h bei 86°C	Cellulase „Onozuka R-10“ von Trichoderma viride	0,1 Gew.% Enzym 2,5 Gew.% Substrat pH 4,8 (0,05M Zitratpuffer) 39°C, 8h, 250rpm	RZ ^{a)} : 281 mg/g Stover Celluloseumsatz.: 52 %	26)
Stover	20 mesh	NaOH	1M NaOH, 7,5 Gew.% Feststoffgehalt, 5h bei 25 °C	Cellulase von P. funiculosum 5,1 IU/mg (bei pH =5,0, 37°C)	2040IU/g Stover 2,5 Gew.% Substrat pH 5,0 (0,05M Zitratpuffer) 37°C, 7h, 100rpm	RZ: 376 mg/g Stover Glucose: 329mg/g St. Celluloseumsatz: 72,5 % Hemicelluloseums.: 22 %	28)
			24h Vorbehandlung		24h Hydrolyse	RZ: 508 mg/g Stover Cellulosekonv: 100 %	
Stover		NaOH	NaOH 2 % , 6,3 % w/v Feststoffgeh. 150°, 15min, 700rpm	Cellulase „Onozuka R-10“ von Trichoderma viride	1,5 % Enzymkonz. 5 % Substratkonz. pH 4,6 40 °C, 48h,	RZ: 280 mg/g Stover (zusätzlich: 240mg/g aus flüssiger Phase der Vorbehandlung)	34)

a) RZ: Reduzierende Zucker, entspricht hauptsächlich Glucose+Xylose

Tab. 23-b: Zusammenschau der Ergebnisse enzymatischer Hydrolysen von Maisernterückständen mit verschiedenen Vorbehandlungsmethoden

Maisteil	Korngröße	Vorbehandlung		enzymatische Hydrolyse			Lit.
		Methode	Parameter	Enzym	Parameter	Hydrolyserate	
Stover	<20,>80 mesh	Ca(OH) ₂	0,1g Ca(OH) ₂ /g Stover 10g H ₂ O/g Stover 5h bei 120 °C	Cellulase: Spezyme-CP von Tichoderma reesei, 700 FPU/g β-Glucosidase: 250 IU/mL	Cellulase: 5 FPU/g Stover Tween 80: 0,15g/g 10 % Substratkonz., pH 4,8 50°, 11h	270 mg (Glucose + Xylose)/g Stover	27)
					192h	550 mg (Glucose + Xylose)/g Stover	
					25 FPU/g Stover, β-Glucosidase: 28,4 IU/ g Stover 100h, 0,15g/g Tween 20	Umwandlungsraten: 100 % der Cellulose 92,3 % des Xylans 97,4 % der gesamten Zucker (kein Tween: 88 %)	
Stover	20-80 mesh	Ca(OH) ₂	0,075 Ca(OH) ₂ /g Stover 5g H ₂ O/g Stover 4h, 120 °C	Cellulase: Spezyme-CP von Tichoderma reesei, β-Glucosidase	50g/L Substrat 10 FPU/g Stover, β-Glucosidase: 28,4 IU/ g Stover pH 4,8 50 °C, 100rpm, 72h	326 mg Glucoseäquiv./g Biomasse 60 % der Cellulose 47 % des Xylans 53 % der Polysaccharide	29)

Tab. 23-c: Zusammenschau der Ergebnisse enzymatischer Hydrolysen von Maisernterückständen mit verschiedenen Vorbehandlungsmethoden

Maisteil	Korngröße	Vorbehandlung		enzymatische Hydrolyse		Lit.	
		Methode	Parameter	Enzym	Parameter		Hydrolyserate
Kolben	3 mm	NH ₄ OH verdünnte HCl	NH ₄ OH 2,9M 26°C, 24h, 0,3 M HCl 100-108°C, 1h	Cellulase 170IFPU/mL	Rest von 20g Kolben in 50 mL H ₂ O, 8,5 IFPU/g Kolben, 50 °C, 48h	377 mg Glucose/g Kolben 92 % der Cellulose	38)
CCSM ^{b)}	0,25- 2mm	ARP ^{c)}	10 % Ammoniak 1mL/min 170 °C, 15min	Cellulase: Cytolase Cl, 95,9FPU/mL β-Glucosidase- Aktivität: 80,6 pNPGU/mL Endoglucanaseakt.: 613 CMCU/mL	60 IFPU/g Glucan Start: 1 % Glucan pH 4,8 (0,05M Zitratpuffer) 50 °C, 150rpm, 72h	94,1 % der nach Vorbehandlung vorhandenen 93,1 % des Glucans = 87,6 % des ursprünglichen Glucans → 334mg Glucose/g CCSM	23)
			60 min			347mg/g, 91 % des Gluc.	
Stover	2mm	verdünnte H ₂ SO ₄	0,45-0,5 % H ₂ SO ₄ 10 % Feststoff, 60min, 160 °C	Cellulase aus T. reesei, 72 IFPU/mL β-Glucosidase (Novozym 188): 250IU/mL	Cellulase: 42 IFPU/g Cellulose β-Glucosidase: 4,9 IU/g Cellulose 50°C, pH 4,8, 24h	270 mg/g Stover 88% der behandelten Cellulose	22)
Kolben			5 min, 140°			320mg/g Kolben 95% der behandelten Cellulose	

^{b)} CCSM: Corn Cob/ Stover Mixture

^{c)} ARP: Ammonia Recycled Percolation Process

Tab. 23-d: Zusammenschau der Ergebnisse enzymatischer Hydrolysen von Maisernterückständen mit verschiedenen Vorbehandlungsmethoden

Maisteil	Korngröße	Vorbehandlung		enzymatische Hydrolyse		Hydrolyserate	Lit.
		Methode	Parameter	Enzym	Parameter		
CCSM	3,2mm	verdünnte H ₂ SO ₄	1 % H ₂ SO ₄ , 10 % Feststoff, 1d einweichen 20-30 % , 160°, 5min	Genecor Laminex Cellulase	40IU/g Feststoff 2 % Feststoffgeh. pH 4,8 (0,05 M Zitratpuffer) Tetracycline: 40g/mL Cycloheximid: 30g/mL 45°, 120h	56 % der theoretischen Glucose, 196mg/g CCSM	42)
			180 °C, 10 min			96 % der theoretischen Glucose 374mg/g CCSM	
Stover	1-2mm	verdünnte H ₂ SO ₄	0,16g H ₂ SO ₄ /g stover 6h bei RT dann 1h bei 86°C	Onozuka R-10 von Trichoderma viride	0,1 % w/v Enzym 2,5 % w/v Substrat pH = 4,8 (0,05M Zitratpuffer) 39°C, 8h, 250rpm	RZ: 163 mg/g Stover Cellulose im festen Rest: 61 % der an- fänglichen	26)
Stover	20 mesh	H ₂ SO ₄	1M H ₂ SO ₄ , 7,5 % Feststoffgehalt, 5h bei 25 °C	Cellulase von P. funiculosum 5,1 IU/mg (bei pH =5,0, 37°C)	2040 IU/g Stover 2,5 % w/v Substrat pH 5,0 (0,05 Zitratpuffer) 37°C, 7h, 100rpm	RZ: 137 mg/g Stover Glucose: 102 mg/St. → Cellulosekonv: 17,5 % der ursprüngl. Hemicellulose: 16,1 % der ursprünglichen	28)

Tab. 23-e: Zusammenschau der Ergebnisse enzymatischer Hydrolysen von Maisernterückständen mit verschiedenen Vorbehandlungsmethoden

Maisteil	Korngröße	Vorbehandlung		enzymatische Hydrolyse		Lit.	
		Methode	Parameter	Enzym	Parameter		Hydrolyserate
Stover	20 mesh	H ₂ SO ₄	1M H ₂ SO ₄ , 7,5 % Feststoffgehalt, 5h bei 25 °C	Cellulase von P. funiculosum 5,1 IU/mg (bei pH =5,0, 37°C)	2040 IU/g Stover 2,5 % w/v Substrat pH 5,0 (0,05 Zitratpuffer) 37°C, 7h, 100rpm	RZ: 137 mg/g Stover Glucose: 102 mg/St. → Cellulosekonv: 17,5 % der urspüngl. Hemicellulose: 16,1 % der ursprünglichen	28)
			24h Vorbehandlung		24h Hydrolyse	RZ: 646 mg/g Stover Cellulosekonv.: 40,6 %	
Stover	20 mesh	HCl	1M HCl, 7,5 % Feststoffgehalt, 5h bei 25 °C	Cellulase von P. funiculosum 5,1 IU/mg (bei pH =5,0, 37°C)	2040IU/g Stover 2,5 % w/v Substrat pH 5,0 (0,05 Zitratpuffer) 37°C, 7h, 100rpm	RZ: 146 mg/g Stover Glucose: 108 mg/g St. → Cellulosekonv: 18,1 % der urspüngl. Hemicellulose: 17,5 % der ursp.	28)
			24h Vorbehandlung		24h Hydrolyse	RZ: 242 mg/g Stover Cellulosekonv: 40,1 %	

Tab. 23-f: Zusammenschau der Ergebnisse enzymatischer Hydrolysen von Maisernterückständen mit verschiedenen Vorbehandlungsmethoden

Maisteil	Korngröße	Vorbehandlung		enzymatische Hydrolyse			Lit.
		Methode	Parameter	Enzym	Parameter	Hydrolyserate	
Stover		Steam-SO ₂	3 % SO ₂ (basierend auf tr. Biomasse), 33 % Feststoff, Dampf, 30min, 0,5 MPa, 160 °C	Cellulase, Hemicellulase, Cellobiase, Pectinase, (+Vitamin B12, Spurenelemente)	20 % der Biomasse Enzym, 12-16 % Feststoff 1Tropfen TritonX 8 5mm Stahlkugeln pH 4,8 (mit Kalk) 140rpm, 50 °C, 48h	590mg/g Stover = 86,5 % der theoretisch möglichen Zucker (Cellulose + Hemicellulose)	47)
CCSM	2mm	ARP-H ₂ O ₂	20 % Ammoniak 0,28g H ₂ O ₂ /g CCSM, Flußrate: 1mL/min 170 °C90 min	Cellulase: Cytolase CI 95,9FPU/mL β-Glucosidase-Aktivität: 80,6 pNPGU/mL Endoglucanaseakt.: 613 CMCU/mL	60 IFPU/g Glucan Start: 1 % Glucan pH 4,8 (0,05M Zitratpuffer) 50 °C, 150rpm, 72h	95 % der nach der Vorbehandlung noch vorhandenen 78 % des ursprünglichen Glucans →282mg Glucose/g CCSM	41)
					24h	84 % der der nach der Vorbehandlung noch vorhandenen 78 % → 250mg Glucose/g CCSM	

Tab. 23-g: Zusammenschau der Ergebnisse enzymatischer Hydrolysen von Maisernterückständen mit verschiedenen Vorbehandlungsmethoden

Maisteil	Korngröße	Vorbehandlung		enzymatische Hydrolyse		Hydrolyserate	Lit.
		Methode	Parameter	Enzym	Parameter		
Mais-rückstände	40-50 mesh	FeTNa	1) Vorhydrolyse: 50 % H ₂ SO ₄ , 90° → Material mit 62 % Cellulose (LIC) 2) 4,2-11,7 mL FeTNa/g LIC	Cellulase von Trichoderma reesei 1 IU/mL (Filterpapier)	3,74 IU/g LIC pH 4,8, Schüttler, 45°, 10h	4,2 mL FeTNa/g LIC: 50 % der Cellulose zu Glucose → 186 mg/g Mais- rückstand 11,7 mL FeTNa/g LIC: ca. 77 % → 286,44 mg/g Mais-rückstand	48)
Stover	2mm	CH ₃ CN	70 % CH ₃ CN, 2 % HCl, 12h bei RT einweichen, 3h unter Rückfluß	Cellulase „Onozuka R-10“ von Trichoderma viride	0,1 % w/v Enzym 2,5 % w/v Substrat pH 4,8 (0,05M Zitratpuffer) 39°C, 8h, 250rpm	RZ ^{a)} : 94 mg/g Stover Cellulose im festen Rest: 16,6 % der an- fänglichen Biomasse	26)
		EtOH	70 % EtOH, 2 % HCl, 12h bei RT einweichen, 3h unter Rückfluß			RZ ^{a)} : 167 mg/g Stover Cellulose im festen Rest: 15,3 % der an- fänglichen	

Tab. 23-h: Zusammenschau der Ergebnisse enzymatischer Hydrolysen von Maisernterückständen mit verschiedenen Vorbehandlungsmethoden

Maisteil	Korngröße	Vorbehandlung		enzymatische Hydrolyse		Hydrolyserate	Lit.
		Methode	Parameter	Enzym	Parameter		
Stover	2mm	Ethylen-diamin (EDA)	12h einweichen mit EDA (6,2mL/g Stover, dann + MeOH (12,2mL/g), +H ₂ O (12,4mL/g) kochen unter Rückfluß, 81°C, 30min	Cellulase „Onozuka R-10“ von Trichoderma viride	0,1 % w/v Enzym 2,5 % w/v Substrat pH 4,8 (0,05M Zitratpuffer) 39°C, 8h, 250rpm	RZ ^{a)} : 335 mg/g Stover Cellulose im festen Rest: 16,2 % der anfänglichen Biomasse	26)
		n-Butylamin (n-BA)	12 einweichen mit n-BA (6,2mL/g Stover), dann + MeOH (10,1mL/g), +H ₂ O (10,3mL/g) kochen unter Rückfluß, 81°C, 30min			RZ: 258 mg/g Stover Cellulose im festen Rest: 20,4 % der anfänglichen Biomasse	

5 Produkte

5.1 Zucker

Die beiden mengenmäßig bei weitem überwiegenden Hydrolyseprodukte aus Maisstroh sind Glucose und Xylose.

5.1.1 Glucose

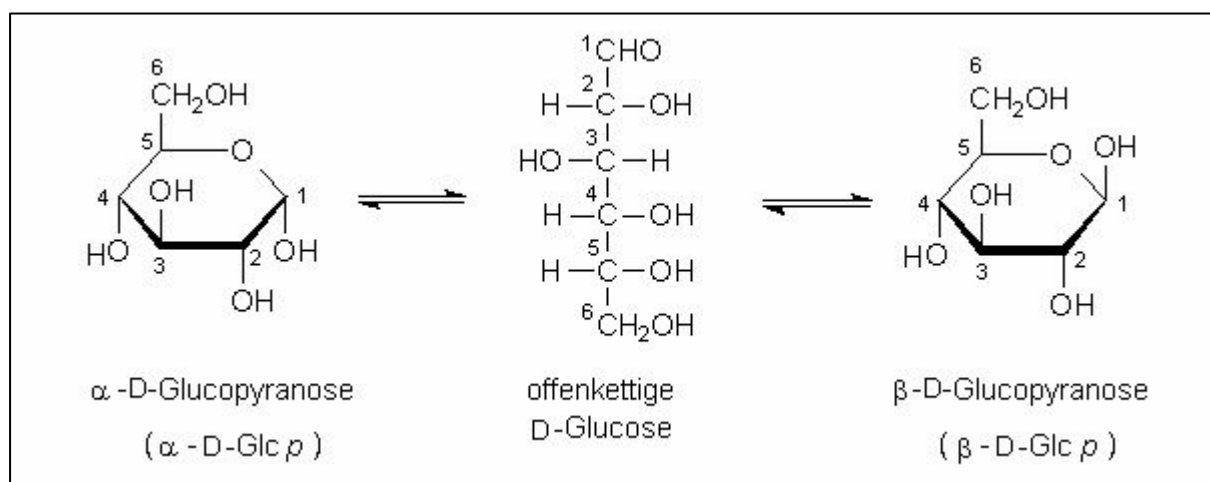


Abb. 26: Glucose⁶⁵⁾

D-Glucose, $C_6H_{12}O_6$, liegt in farb- und geruchlosen, süß schmeckenden Kristallen vor. In Wasser ist Glucose sehr leicht, in Ether, Aceton und Essigester nicht löslich. Glucose liegt meist in pyranosider 6-Ring - Form vor (siehe Abb. 26).

D-Glucose kommt in reinem kristallinen Zustand als sogenannte Dextrose sowie in 5-50% Lösung in den Handel. Intravenöse Einspritzungen werden zum Beispiel bei Herzmuskelentzündungen, Erschöpfungserscheinungen, Verdauungsbeschwerden, zur parentalen Ernährung usw. verwendet. Glucose kann auch Bakterienwachstum hemmen (z.B. bei Zusatz von 10-35 g D-Glucose zu 100 g Nährlösung), daher setzt man sie verschiedenen Wundsalben zu.

Ein erheblicher Teil der Glucose geht in Form von Glucosesirup in die Herstellung von Süßwaren, insbesondere Zuckerwaren, wobei zunehmend Isosirup (enzymatisch isomerisierter Glucosesirup) eingesetzt wird.⁶⁶⁾

Glucose steht im Mittelpunkt des Kohlenhydratstoffwechsels und ist Ausgangsprodukt für viele biotechnologisch gewonnene Chemikalien (siehe Abb. 27).

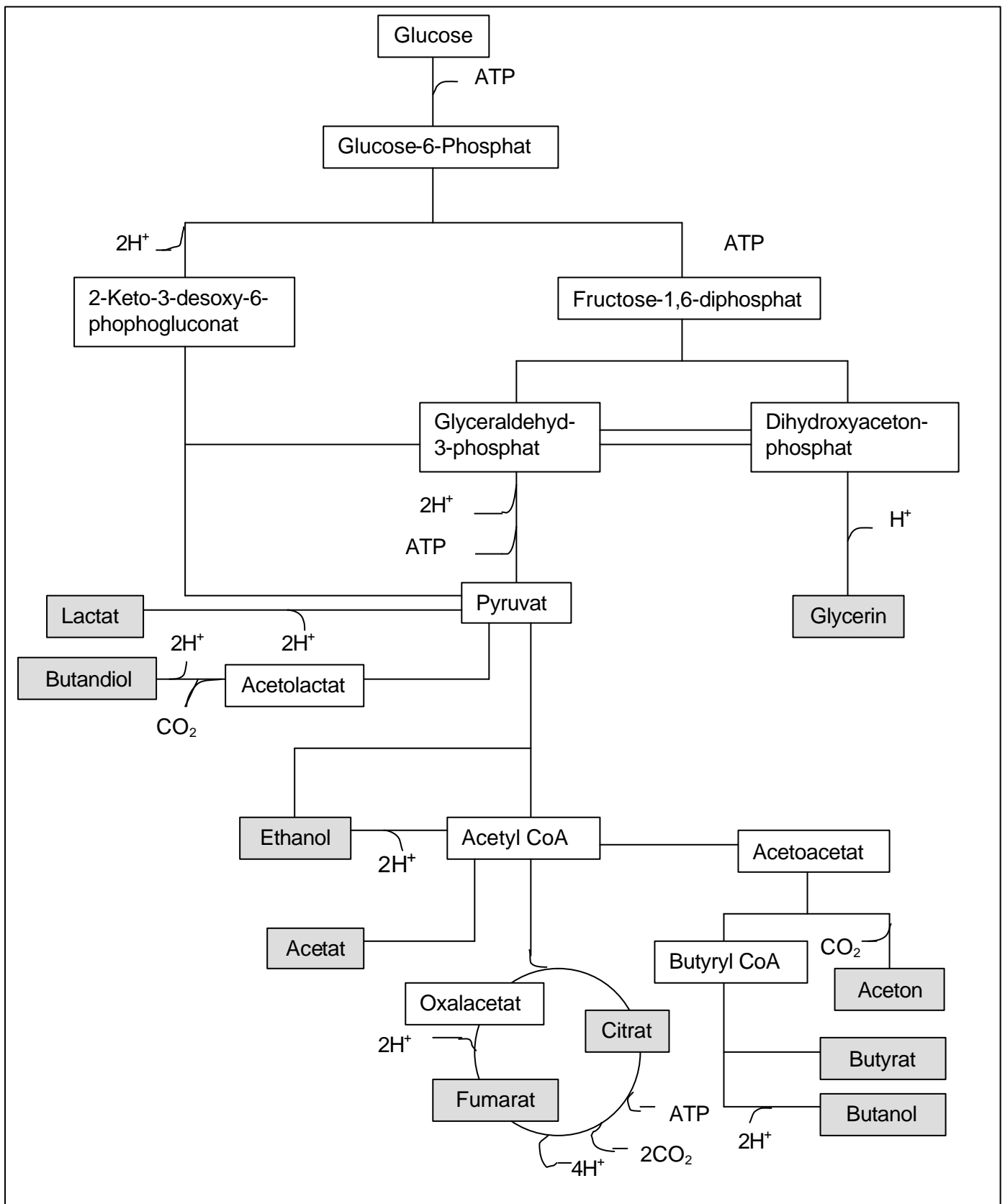


Abb.27: Überblick über mikrobielle Stoffwechselwege von Glucose zu verschiedenen Endprodukten⁶⁷⁾

5.1.2 Xylose

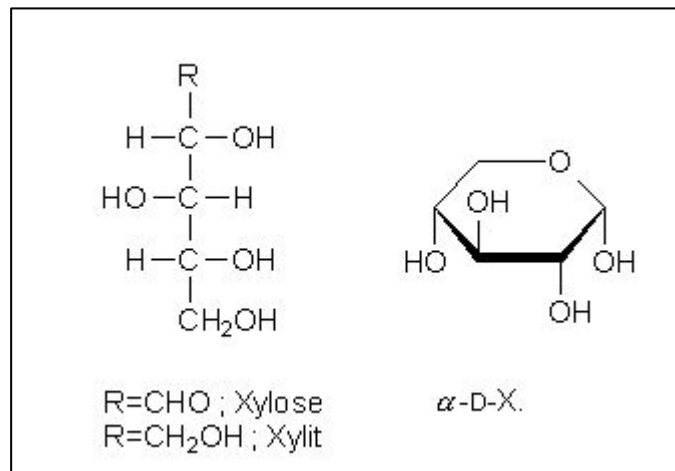


Abb. 28: Xylose

Xylose, $C_5H_{10}O_5$, bildet farblose Nadeln oder Prismen. Sie ist süß mit einem Süßwert von 67 (Saccharose: 100). Der Schmelzpunkt liegt bei 144°C . Xylose ist in Wasser leicht löslich, in Pyridin und heißem Ethanol löslich. In Kristallen liegt Xylose als $\alpha\text{-D-Xylopyranose}$ vor (siehe Abb. 25).

D-Xylose wird vom menschlichen Stoffwechsel schlecht verwertet und größtenteils ausgeschieden.⁶⁸⁾

5.2 Folgeprodukte

Besonders Glucose aber auch Xylose ist Ausgangsstoff für viele chemische und biotechnologische Umsetzungen zu Folgeprodukten. Einige dieser Verfahren wurden bereits großtechnisch realisiert (siehe Abb. 29), wobei in diesen Verfahren meist von reiner Glucose und nicht von Zuckern in Pflanzenhydrolysaten ausgegangen wird.

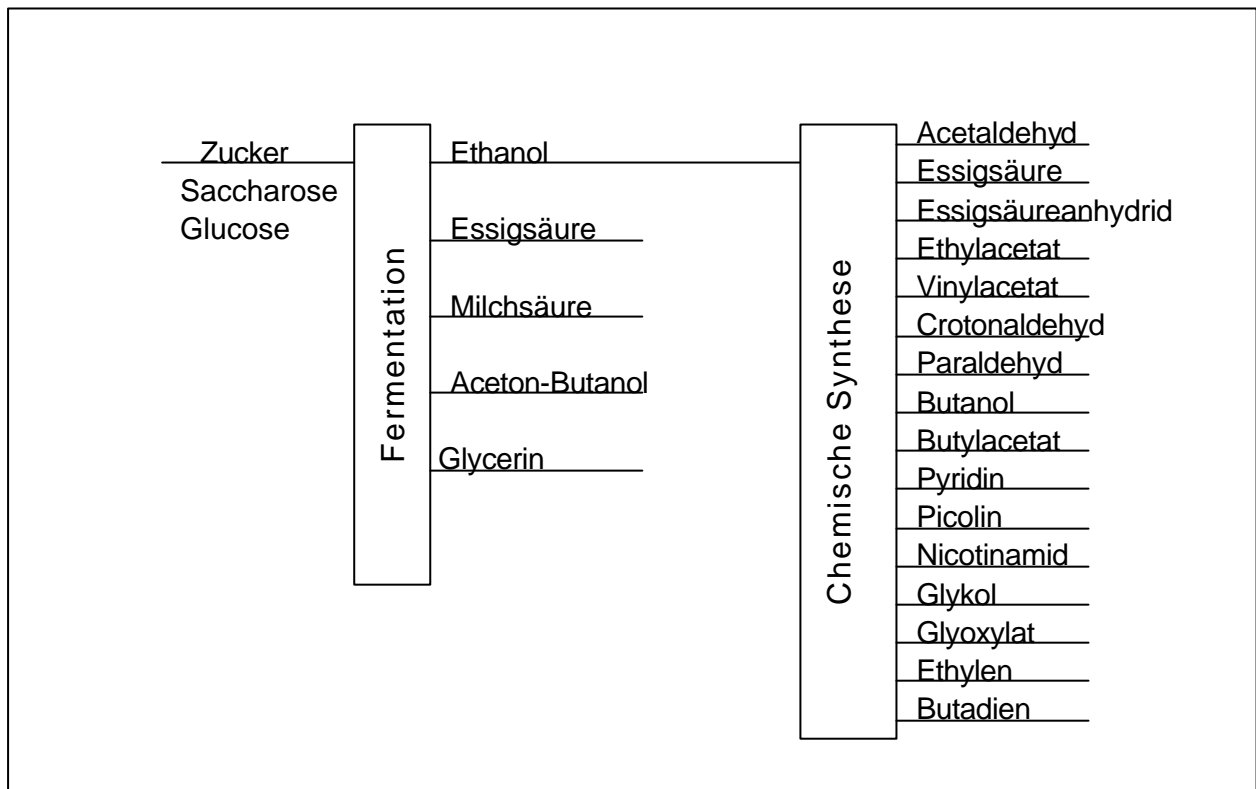


Abb. 29: Großtechnisch realisierte Produktionsverfahren zur Herstellung von C₂-, C₃- und C₄-Chemikalien ⁶⁹⁾

Gegenwärtig ist man bemüht, neue Rohstoffe bzw. neue Kohlenhydratquellen für die Fermentation zu Ethanol und anderen organischen Chemikalien zu finden. Als besonders aussichtsreich wird die Nutzung von Lignocellulose erachtet. Derzeitige Forschungsaktivitäten sind in Abb. 30 (Seite 104) dargestellt.

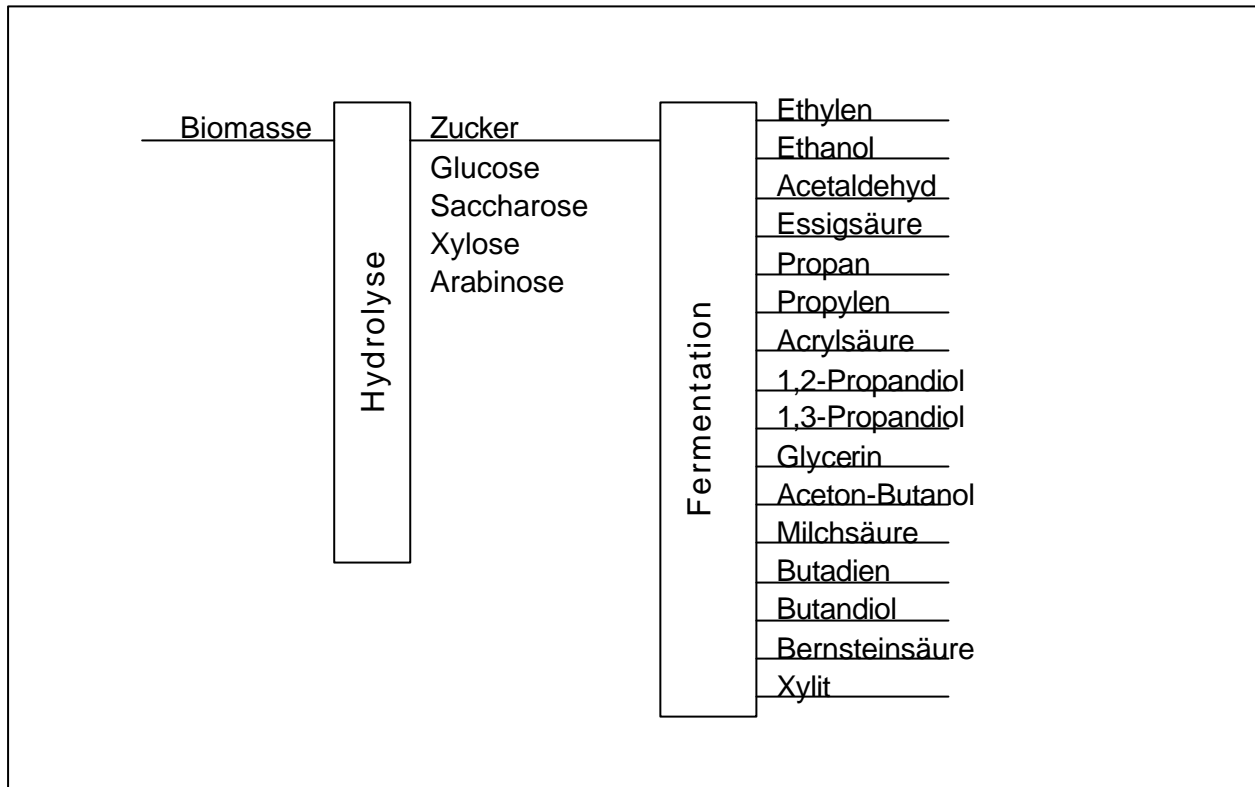


Abb. 30: Derzeitige Forschungsaktivitäten zur Produktion von C₂-, C₃- und C₄-Chemikalien ⁶⁹⁾

Die Beschreibung all dieser Prozesse geht über den Umfang dieser Arbeit hinaus und kann in der Literatur nachgeschlagen werden.

Es sollen aber hier noch einige Produkte behandelt werden, zu denen Forschungsarbeiten mit Maisstroh als Ausgangsmaterial vorliegen.

5.2.1 Ethanol

Ethanol ist sicher das am besten untersuchte Folgeprodukt aus Cellulose- oder Hemicellulosehydrolysat. Besonders in den USA wird viel Forschungsarbeit zur Gewinnung von Ethanol aus Ernterückständen, speziell von Mais, geleistet. Verfahren, die von Maisstärke, also den Maiskörnern, ausgehen, werden bereits seit längerem umgesetzt. Der Ethanolmarkt erreichte 1995 in den USA eine Produktionskapazität von 5,3 Millionen Liter, wobei Ethanol durch eine Befreiung von der Bundesverbrauchssteuer gestützt wird.

Ethanol wird zum größten Teil als CO₂-neutraler Treibstoff eingesetzt, dient aber auch als Ausgangsmaterial für andere Chemikalien.

Österreich wurde in den vergangenen Jahren vielfach als Vorreiter bei der Nutzung nachwachsender Rohstoffe angesehen. Besonders die Entwicklungen im Bereich der Verzuckerung von Lignocellulose, welche letztendlich zur Errichtung einer Pilotanlage in Linz (Vabio) geführt hatten, wurden und werden heute noch international viel beachtet. Seit dem Scheitern des sogenannten Austrprot-Projekts der Bioethanol-ProduktionsgesmbH unter Beteiligung von Landwirtschaft, ÖMV AG, der Raiffeisenorganisation und des Handels Anfang der neunziger Jahre ist die Produktion von Bioethanol allerdings kein Thema mehr. Über aktuelle Programme zur Wiederaufnahme von Verhandlungen ist nichts bekannt.⁶⁹⁾

Aufgrund des vorhandenen Know-hows zur Ethanolerzeugung aus Lignocellulose und der derzeit eher ungünstigen Situation dafür wurde die Erzeugung von Ethanol von Anfang an im Rahmen der Studie „Mais und Mehr“ nicht als mögliche Verwertungsschiene für das steirische Maisstroh in Betracht gezogen und daher auch keine Literaturrecherche dazu durchgeführt.

Die derzeit aussichtsreichste Möglichkeit, die Produktivität der Bioethanolerzeugung aus Lignocellulose zu erhöhen und damit die Konkurrenzfähigkeit zu steigern, liegt in der Suche nach Mikroorganismen, die nicht nur Hexosen (wie *Saccharomyces cerevisiae*) sondern auch die wesentlich seltener als Substrat verwendete Xylose umsetzen können. Dies kann entweder durch verstärktes Screening von noch nicht untersuchten Mikroorganismen geschehen, oder durch den Einsatz der Gentechnik, mit deren Hilfe Organismen mit den gewünschten Eigenschaften erzeugt werden können.

Tabelle 24 (Seite 106) gibt einen kurzen Überblick über einen biotechnologischen Ethanolerzeugungsprozeß, der von der Firma Agrol in Guilford (England) entwickelt und

in Betrieb genommen wurde. Die volumetrische Produktivität ist fünffach höher als mit Hefen. Die hohe Temperatur des Prozesses reduziert Kosten für Sterilisation und Produktaufarbeitung.⁶⁹⁾

Tab. 24: Ethanolproduktion aus C₅/C₆-Hydrolysaten⁶⁹⁾

Prozeß:	biotechnologisches Verfahren
Rohstoff:	C ₅ /C ₆ -Hydrolysate
Substratspektrum:	Cellobiose, Pentose
Mikroorganismus:	Bacillus stearothermophilus
Wild-/rekombinanter Stamm:	Mutante LLD-116
Pathogenität:	nein
Fermentationsverfahren:	Agrol „Closed System“ Process (Cell Recycle Reactor)
Prozeßcharakterisierung:	anaerob
pH-Wert	im sauren Bereich
Temperatur [°C]:	70-75
thermophil	ja
Ausbeute prakt. [kg/kg]:	0,4
Effizienz (Ausbeute prakt/theor.) [%]:	78
Nebenprodukte:	Acetat, Formiat, CO ₂
Sterilisation:	nein
Aufreinigung:	Strippung, Membranevaporationsmodul

5.2.2 Milchsäure

5.2.2.1 Anwendungen

Der Großteil der Milchsäure findet in der Lebensmittelindustrie zur Ansäuerung, Konservierung und in Form von Calcium – und Natriumlactat als Geschmacksverstärker Anwendung.

Weitere Einsatzgebiete sind Kunststoff- und Lackherstellung, die Kosmetik und die chemische Industrie, wo Milchsäure als Ausgangsprodukt für andere Chemikalien eingesetzt wird.²⁾

Ein für die Zukunft ausgesprochen interessanter Anwendungsbereich für Milchsäure ist die Umsetzung zu Polymilchsäure, einem biologisch abbaubaren Kunststoff. Die Einsatzbereiche für diesen Kunststoff sind sehr weitläufig und reichen von der Medizin über das Verpackungswesen bis zur Landwirtschaft.⁶⁹⁾

5.2.2.2 Fermentationsprozeß

Grundsätzlich kann Milchsäure auf chemischem und biotechnologischem Weg hergestellt werden. Der Anteil Milchsäure, welcher weltweit chemisch synthetisiert wird, ist auf 15% zurückgegangen. Die restlichen 85% werden biotechnologisch durch Fermentation hergestellt.

Die industrielle Milchsäureproduktion setzt Melasse, Saccharose und Glucose aus Stärkehydrolysaten als Rohstoff ein. Neuer Untersuchungen gehen auch in Richtung lignocellulärer Materialien, die geringere Reinheit dieser Ausgangsmaterialien verursachen jedoch einen höheren Aufwand bei der Aufreinigung.

Neben der eigentlichen Kohlenstoffquelle sind diverse Wachstumssupplemente notwendig.

Die Industrie hat einer Reihe von verschiedenen Stämmen für die technische Produktion von Milchsäure adaptiert. Die wichtigsten Stämme sind homofermentative Milchsäurebakterien der Spezies *Lactobacillus*, *Streptococcus* und *Pediococcus*.⁶⁹⁾

5.2.2.3 Milchsäure aus Maisstrohydrolysat

Da die milchsäurebildenden Organismen keine Pentosen verwerten können, ist eine Abtrennung der Hemicellulose während der Vorbehandlung und gesonderte Verwertung derselben auf jeden Fall nötig.

Die Bildung von Milchsäure aus Maisstroh kann entweder über ein zweistufiges Verfahren mit getrennter Hydrolyse und Fermentation oder eine simultane Hydrolyse und Fermentation laufen. Die simultane Hydrolyse und Fermentation eignet sich hier ganz besonders, weil einige Spezies der Milchsäurebakterien sehr ähnliche optimale Fermentationsbedingungen aufweisen wie Cellulasen.

Die erreichbaren Ertragskoeffizienten liegen bei etwa 0,8 g Milchsäure/g Glucose,²⁾ die erreichte Ausbeute der industriell bereits eingesetzten Fermentation von reiner Glucose liegt bei 0,8-0,95 g Milchsäure/g Glucose.

Mit *Lactobacillus delbriium* konnten in einer simultanen Hydrolyse und Fermentation eine Ausbeute von 300 g Milchsäure/kg Kolben (siehe Tab. 25) erreicht werden.

Tab. 25: Milchsäureproduktion aus Maiskolben ²⁾

Mikroorganismus:	Lactobacillus delbriium
Substrat:	Maiskolbenrückstand aus Xyloseproduktion (ca. 100g Kolben/L)
Vorbehandlung:	Hemicellulosenhydrolyse mit verdünnter H ₂ SO ₄
Fermentation:	simultan, 5000 FPU/kg Rückstand
Medium:	komplexe Stickstoffquellen, Mineralstoffe, Spurenelemente
Temperatur:	50°C
pH:	4,8-5
Reaktor:	Rührkessel im batch-Betrieb
Ausbeute:	300g/kg Kolben

5.2.3 2,3-Butandiol

5.2.3.1 Eigenschaften und Anwendungen

Butandiol ist eine farb- und geruchlose Flüssigkeit mit hohem Siedepunkt (180-184°C) und einem hohen Gefrierpunkt von 7,6°C. Der Heizwert von Butandiol (27,198 J/g) entspricht etwa dem von Ethanol und Methanol. Es kann zu Methylethylketon dehydriert und zur Oktanzahlerhöhung eingesetzt werden. Methylethylketon kann zu 1,3-Butadien dehydriert und zu Styren dimerisiert werden.

Daher wird Butandiol industriell hauptsächlich als Ausgangsprodukt für Polymere und zur Butadienherstellung eingesetzt.¹¹⁾

5.2.3.2 mikrobielle Produktion von 2,3-Butandiol

Unter allen Isomeren ist 2,3-Butandiol das einzige, das durch Mikroorganismen produziert werden kann. In den 40iger Jahren wurden in den USA und Kanada Fermentationsprozesse für die Herstellung von 2,3-Butandiol entwickelt, die aber nie eine kommerzielle Anwendung erreichten.

Besonders interessant ist die Fermentation mit *Klebsiella oxytoca* (*K. pneumonia*), weil dieser Mikroorganismus Glucose und Xylose beinahe gleich gut und auch annähernd gleich schnell verwerten kann. Die Umsatzraten können 90% erreichen.

Die Aufarbeitung der Fermentationsbrühe stellt allerdings eine große Schwierigkeit dar. Durch den hohen Siedepunkt und die Hygroskopizität ist es schwer, 2,3-Butandiol abzutrennen. Ein neueres Verfahren schlägt eine Kombination aus Aussalzung (K_2CO_3) und Lösungsmittelextraktion (Isopropanol) vor. Es konnte eine 100%ige Abtrennung erreicht werden.⁶⁹⁾

5.2.3.3 2,3-Butandiol-Produktion aus Maisstroh

Obwohl die optimalen Bedingungen für Cellulasen und Hemicellulasen und butandiolbildenden Mikroorganismen nicht sehr gut übereinstimmen, wird auch hier die simultane Hydrolyse und Fermentation eingesetzt. Tabelle 26 gibt einen Überblick über zwei Verfahren zur Butandiolherstellung aus Maiskolben und Maisstengel.²⁾

Der pH-Wert darf für die Produktion von 2,3-Butandiol nicht zu hoch sein. Bei pH-Werten über 6,5 werden hauptsächlich organische Säuren gebildet. Das pH-Optimum für *K. oxytoca* liegt bei 5,5-6,5.¹¹⁾

Tab. 26: Zwei Prozesse zur 2,3-Butandiol-Produktion aus Maisstroh²⁾

Organismus:	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
Substrat:	Cellulose aus Maiskolben 160 g/L	Hemicellulose aus Maisstengel 20g/L
Medium:	Hefeextrakt: 19 g/L Malzextrakt: 19 g/L Pepton: 31 g/L	Yu and Saddler
Vorbehandlung:	Ligninentfernung mit NH ₃ Hydrolyse mit verd. Säure	Dampfexplosion
Hydrolyse:	simultan, 8500 U/kg	1 Tag nur Hydrolyse 3*10 ⁶ U/kg Hemicellulose, dann Zusatz von Inokulum
pH:	-	6,5
Temp:	35	30
Ausbeute	155 g/kg Cellulose	130 g/kg Hemicellulose

5.2.4 Xylit

5.2.4.1 Eigenschaften und Anwendungen

Xylit ist ein Zuckeralkohol mit fünf Kohlenstoffatomen (siehe auch Abb. 25), der in der Natur in kleinen Mengen (< 0,9g/100g) in Früchten und Gemüse vorkommt. Der Polyalkohl ist ein Süßstoff.

Durch seine leichte Löslichkeit in Wasser und in seiner Süßkraft ist er Saccharose sehr ähnlich, auch der Kaloriengehalt ist annähernd gleich. Allerdings wird Xylit nur langsam adsorbiert und in den Metabolismus eingeschleust, ohne den Glucosespiegel im Blut schnell zu erhöhen. Daher findet Xylit als Saccharoseersatz Anwendung.

Ein weiterer großer Vorteil von Xylit besteht in der Tatsache, daß es von karieserzeugenden Bakterien nicht als Substrat verwendet werden kann. Eine Reihe von großflächigen Langzeitversuchen in verschiedenen Ländern hat gezeigt, daß schon der Konsum von relativ kleinen Mengen an Xylit die Neubildung von Karies deutlich hemmen kann.

Xylit bewirkt außerdem ein angenehm kühles und frisches Gefühl im Mund.

Xylit findet ein breites Anwendungsfeld als einziges Süßungsmittel oder in Kombination mit anderen in Lebensmitteln mit normalem oder reduzierten Kaloriengehalt für Kleinkinder oder Diabetiker.

Außerdem wird Xylit in der Pharmazie und in Artikeln zur Mundhygiene eingesetzt.⁶⁵⁾

Leider ist Xylit allerdings einer der teuersten Polyol-Süßstoffe. Verfügbarkeit und die Produktionskosten verhindern eine häufigere Verwendung dieses Stoffes.

5.2.4.2 Produktion von Xylit

5.2.4.2.1 Chemische Reduktion

Herkömmlicherweise wird Xylit großindustriell über eine chemische Reduktion von Hemicellulosehydrolysaten hergestellt. Birkenhydrolysat ist hierbei das üblichste Substrat.

Die durch Säurehydrolyse hergestellte Xylose (entweder in Lösung oder kristallisiert) wird zu Xylit hydrogeniert und dieses kristallisiert.

Der kritische Schritt in diesem Prozeß ist die Reinigung der Xyloselösung aus der Säurehydrolyse. Die zur Entfernung von Salzen verwendete Ionenaustauschchromatographie kann nämlich die verschiedenen anderen Zucker aus der Hemicellulose nicht beseitigen, die die Kristallisation und Reinigung der Xylose behindern.

Der chemische Prozeß ist außerdem durch die hohen für die Hydrogenierung erforderlichen Temperaturen und Drücke sehr teuer.

5.2.4.2.2 Fermentative Erzeugung

Die bestehenden Unzulänglichkeiten in der konventionellen Herstellung von Xylit haben Forscher motiviert, Alternativen zu suchen. Eine der attraktivsten Varianten ist heute die mikrobielle Produktion.

Allgemein werden unter den Mikroorganismen Hefen als die fähigsten, was die Umwandlung von Xylose zu Xylit betrifft, angesehen. Bekannte xylosefermentierende Stämme sind: *Candida boidinii*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* und *Debaryomyces hansenii*.

Prozeßparameter:

Supplementierung: Für einige Hefen ist der Zusatz von Hefeextrakt wichtig, andere brauchen Harnstoff, Casamino­säuren oder Biotin.

Die optimale **Temperatur** liegt bei 30°C, bei Temperaturen von (je nach Stamm) 37-45°C kommt es zu einem starken Abfall in der Xylitproduktion. Innerhalb des optimalen Wachstumsbereich fördern höhere Temperaturen eher die Bildung von Xylit und weniger die Weiterreaktion zum Folgeprodukt Ethanol.

Da der **pH-Wert** während der Fermentation fällt, ist ein Startwert von 7 optimal, falls der pH-Wert nicht geregelt wird. Wird er allerdings eingestellt, ist ein pH von 5,5 optimal.

Bei einer Steigerung der **Inokulummenge** konnten für einige Stämme eine drastische Verkürzung der Fermentationszeit und eine Steigerung in der Xylitproduktion beobachtet werden. Es wurde außerdem festgestellt, daß zum Beispiel für *Candida guilliermondi* 15 Stunden alte Zellen wesentlich schlechtere Xylitproduktivitäten liefern als 24 Stunden alte oder ältere.

Die **Substratkonzentration** ist ein sehr wichtiger Parameter in der Xylitproduktion. Ohne Anwesenheit von D-Xylose kommt es zu keiner Xylitbildung. Hohe D-Xylosekonzentrationen induzieren die Xylitbildung in Hefen. Sie führen zu einer erhöhten Xylitbildung im Vergleich zur Ethanolbildung. Ist Glucose vorhanden, wird D-Xylose mit geringerer Ausbeute zu Xylit umgesetzt.

Ein weiterer sehr wichtiger Parameter ist die **Belüftung**. Unter voll aeroben Bedingungen wird kein Xylit gebildet, ohne Sauerstoff wachsen die Hefen aber auf D-Xylose nicht. Fermentation und Wachstum finden gleichzeitig nur unter Sauerstofflimitierung statt.⁶¹⁾ (Mit *Candida* Sp. 11-2 wurde allerdings eine Xylitproduktion unter aeroben Bedingungen mit gutem Erfolg durchgeführt, siehe unten)

5.2.4.3 Xylitproduktion aus Maiskolben

Hemicellulosenhydrolysate aus Maiskolben können mittels katalytischer Reduktion oder über eine Fermentation zu Xylit umgesetzt werden (siehe Tabelle 27, Seite 114).

Tab. 27: Xylitproduktion aus Maiskolben

Methoden	Substrat	Konzentration	Mikroorganismus/ Katalysator	Medium [g/L]	Inokulum	Bedingungen	Ausbeute	Literatur
fermentativ	Xyloelösung aus Hemicellulosen -hydrolyse mit Säure	70g/L	Candida sp. 11-2	Bactohefe: 3 Bactomalz: 3 Bactopepton: 5	k.A.	32°C aerob 200 rpm 48 h	120 g/kg Kolben, 45% Xyl.- Umsatz	39)
fermentativ		50g/L	Candida parapsilosis	Hefeextrakt: 5 KH ₂ PO ₄ : 5 (NH ₄) ₂ SO ₄ : 2 MgSO ₄ ·7H ₂ O: 0,2	5%	30°C 0,5 vvm Belüftung 200 rpm pH 5 60h	66% Xyl.- Umsatz	44)
katalytisch		25%	Raney-Nickel 10%	-	-	75 atm 10 h 30°C	196 g/kg Kolben	24)

5.3 Lignin

Auch das Lignin, das im Zuge der Vorbehandlung abgetrennt werden kann, lässt sich weiterverarbeiten. Abb. 31 zeigt mögliche Folgeprodukte aus Lignin auf.

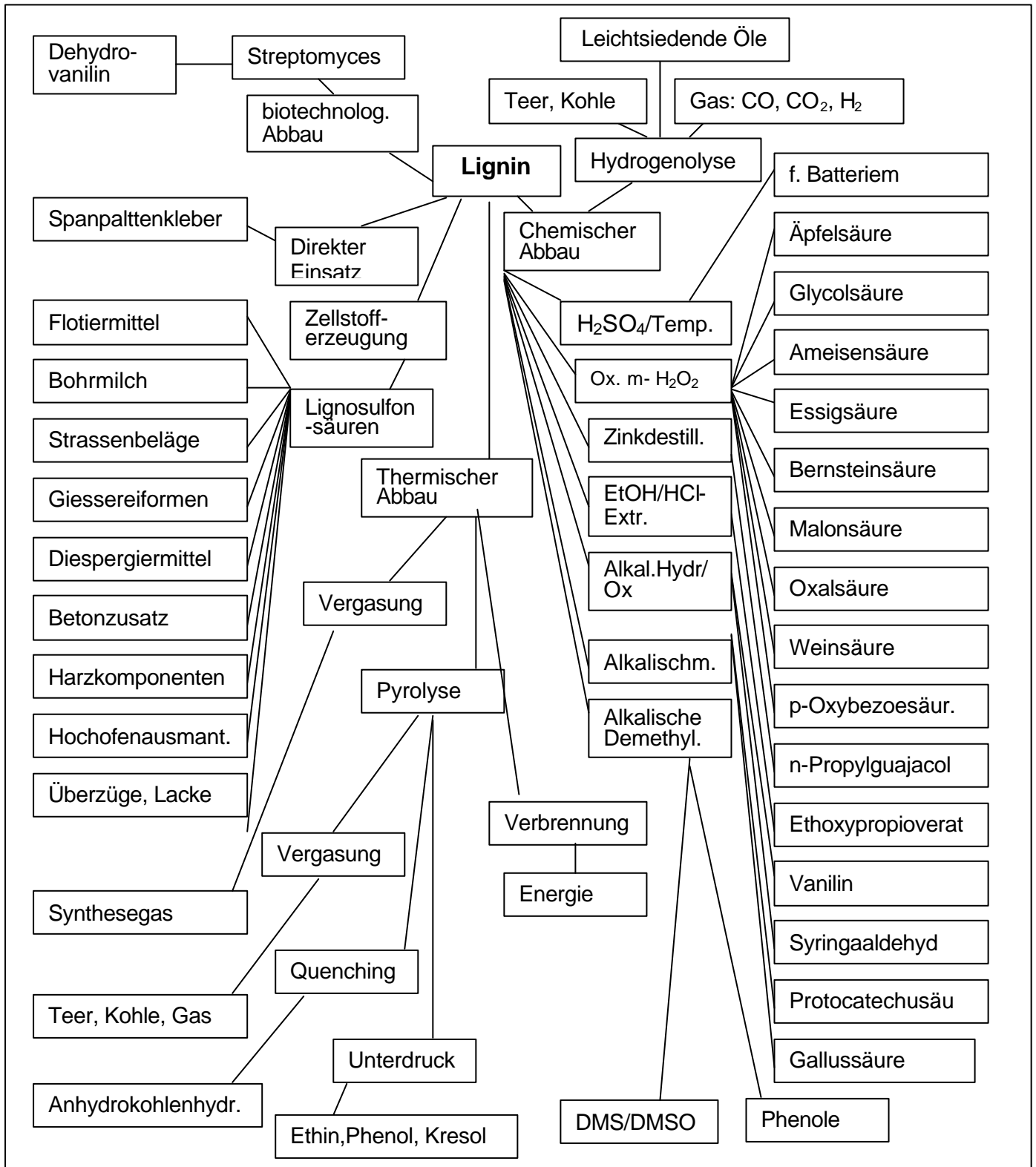


Abb. 31: Verschiedene Ansätze zur Verwertung von Lignin⁷⁰

6 Zusammenfassung

6.1 Allgemeines

In der Steiermark fallen jährlich 500000 t an Mais-Ernterückständen an, die meist ungenutzt auf den Feldern verbleiben und so ein billiges Rohstoffpotential bilden. Eine dezentrale Verwertung dieser Biomasse könnte einerseits wirtschaftliche Impulse für die ländlichen Regionen des Landes liefern und wäre außerdem ein Schritt in Richtung vermehrter Nutzung nachwachsender CO₂-neutraler Rohstoffe und somit ein Beitrag zum Klimaschutz.

Der Weg zu einer wirtschaftlichen und nachhaltigen Verwertung kann nur über geringe Transportwege, das heißt kleine dezentrale Anlagen und technologisch und ökonomisch optimierte Lagerung des Maisstrohs führen.

Ökonomische Konkurrenzfähigkeit wird auch nur über integrierte Verwertungskonzepte erreichbar sein, also Verfahren, in denen alle Teile der Maispflanze in Produkte mit möglichst großer Gewinnspanne umgesetzt werden. Dies kann durchaus zu sehr verschiedenen Aufarbeitungen für zum Beispiel Kolben und Stengel führen.

Maisstroh besteht zu mindestens 60% aus den Kohlenhydratpolymeren Cellulose und Hemicellulose. Cellulose wird aus Glucose aufgebaut, Hemicellulose im Fall des Mais zum überwiegenden Teil aus Xylose. Der dritte Hauptbestandteil des Maisstrohs ist Lignin. Maisstroh ist also ein lignocellulärer Rohstoff.

Eine mögliche Verwertung für Maisstroh ist die saure oder enzymatische Hydrolyse der Cellulose und Hemicellulose zur Gewinnung von Zuckerlösungen, die dann weiter verarbeitet werden können. Mit diesem Bereich der Verarbeitungsmöglichkeiten für Mais-Ernterückstände beschäftigt sich diese Arbeit.

6.2 Vorbehandlung

Cellulose, Hemicellulose und Lignin bilden im Maisstroh ein sehr komplexes und besonders für Enzyme schwer durchdringbares Gerüst. Außerdem liegt Cellulose teilweise in kristalliner Form vor. Aus diesen Gründen ist eine entsprechende Vorbehandlung zum Aufschluß dieser Strukturen vor einer enzymatischen aber auch vor einer sauren Hydrolyse notwendig.

Außerdem können mit bestimmten Vorbehandlungstechniken Lignin und Hemicellulose als eigene Fraktionen abgetrennt und einer separaten Verwertung zugeführt werden.

Abbildung 32 gibt einen Überblick über mögliche Vorbehandlungsmethoden für Lignocellulosen.

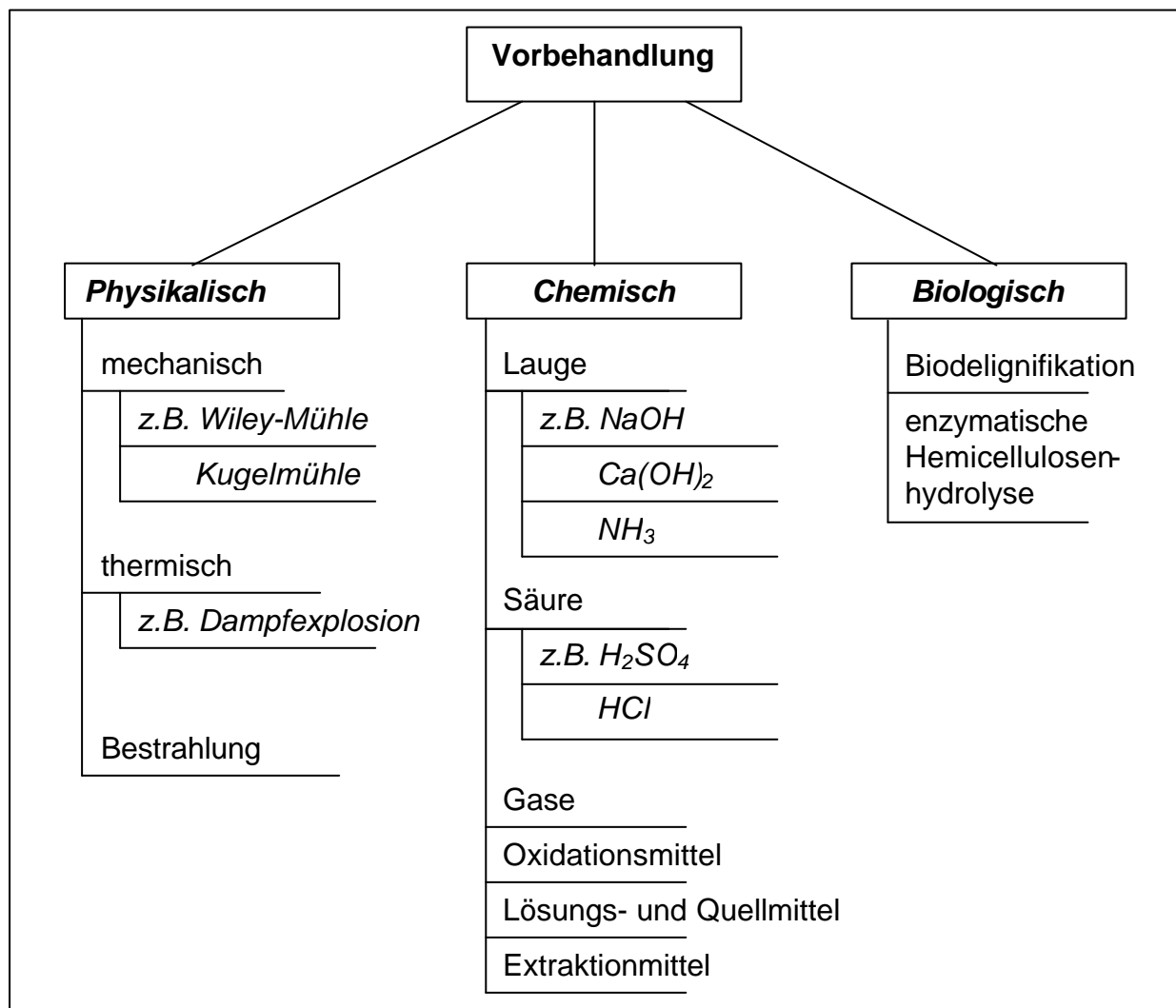


Abb. 32: Vorbehandlungsmethoden für Lignocellulose

6.2.1 physikalische Vorbehandlung

mechanische Vorbehandlung:

Mahlung in einer Kugelmühle kann zwar die Hydrolyserate erhöhen, ist aber sehr teuer. Bei Maisstroh bringt eine Zerkleinerung unter 0,8 mm keine Verbesserung in der Hydrolyserate mehr, meist wird auf ca. 2 mm zerkleinert. Am häufigsten wird die Wiley-Mühle, eine Messermühle, eingesetzt.

thermische Vorbehandlung:

Häufig eingesetzt wird die Dampfexplosion, bei der ohne weiteren Chemikalienzusatz mittels heißem Dampf auf eine Temperatur erhitzt wird, bei der Hemicellulose gespalten, Cellulose aber noch nicht zerstört wird.

Durch Dampfexplosion läßt sich Hemicellulose gut von Cellulose und Lignin trennen, allerdings nicht mit optimalen Ausbeuten. Außerdem wird durch die hohen Temperaturen die Bildung von Furfural und anderen toxischen Nebenprodukten gesteigert.

Bestrahlung:

Die Bestrahlung ist zu kostenintensiv, um für einen großtechnischen Einsatz in Frage zu kommen.

6.2.2 chemische Vorbehandlung

Lauge:

Durch Behandlung mit Lauge kommt es hauptsächlich zur Delignifikation und zu einer Quellung der Cellulosefasern. Je nach gewählten Reaktionsbedingungen wird auch ein Teil der Hemicellulose gelöst, besonders bei höheren Temperaturen.

Natronlauge ist die gebräuchlichste Lauge zur Vorbehandlung von Lignocellulosen, Calciumhydroxid ist allerdings billiger und läßt sich als Calciumcarbonat wiedergewinnen. Ammoniak ist leicht flüchtig und kann nahezu zu 100% zurückgewonnen werden.

Für ein integriertes Aufarbeitungskonzept für Maisstroh muß eine Optimierung der Reaktionsbedingungen so erfolgen, daß Lignin möglichst vollständig abgetrennt, Hemicellulose aber nicht gespalten wird und wenn möglich die Lauge zurückgewonnen werden kann. Dies wird bei geringeren Temperaturen (um die Raumtemperatur) und dafür etwas längeren Reaktionszeiten der Fall sein. Für Ammoniak wurde von einer bis zu 90%igen Delignifizierung berichtet.

Eventuell könnte bei einer gemeinsamen Lösung von Lignin und einem Teil der Hemicellulose das Lignin auch aus der Reaktionslösung gefällt und einer getrennten Verarbeitung zugänglich gemacht werden. Die Hemicellulosefraktion könnte mit dem später zum Beispiel durch milde saure Hydrolyse gelösten Rest der Hemicellulose vereinigt und ebenfalls verwertet werden.

Säure:

Die Behandlung mit verdünnter Säure (meist Schwefelsäure) ist eine Methode, spezifisch die Hemicellulose zu hydrolysieren. Durch die wesentlich leichtere Spaltbarkeit der Hemicellulose gegenüber der Cellulose findet die Reaktion bereits bei relativ milden Bedingungen statt (je nach Reaktionszeit von wenigen Minuten bis zu einem Tag bei 140°C-180°C bzw. Raumtemperatur). Je höher die Temperatur ist, desto kürzer müssen die Reaktionszeiten gehalten werden, um einerseits eine Mithydrolyse der Cellulose und andererseits den Abbau der aus der Hemicellulose gebildeten Zucker zu verhindern. Dies ist nicht nur in Hinblick auf eine möglichst hohe Ausbeute von Bedeutung, sondern besonders auch weil die Abbauprodukte wie Furfural für Mikroorganismen toxisch sind und daher bei folgende Fermentationen stören.

Gase, Oxidationsmittel, Cellulose-Lösungsmittel, Extraktionsmittel:

Die Anwendung der oben genannten Chemikalien führt meist zu einer Lösung des Lignins und kann im kleinen Maßstab auch zu brauchbaren Ergebnissen führen. Im großen Maßstab ist eine Anwendung aufgrund der höheren Preise, der aufwendigeren Verfahren und besonderes der häufigen Toxizität der Chemikalien wenig aussichtsreich.

In Bezug auf Maisstroh liegen wenige Forschungsarbeiten vor. Erwähnenswert ist der Versuch, die Lösung der Kohlenhydrate im Zuge der Delignifikation mit Natronlauge durch Ethanolzusatz zurückzudrängen.

6.2.3 Biologische Vorbehandlung

Enzymatische Spaltung der Hemicellulose:

Mikroorganismen produzieren Enzyme, die Hemicellulose spalten können. Über enzymatische Abtrennung der Hemicellulosen aus Maisstroh von der Cellulose liegen allerdings keine Forschungsberichte vor. Diese Methode scheint gegenüber der Hemicellulosenhydrolyse mit verdünnter Säure keine nennenswerten Vorteile zu bringen und ist daher bisher anscheinend nicht konkurrenzfähig.

Biodelignifikation:

Mikroorganismen, besonders Pilze aber auch Bakterien, sind in der Lage, Lignin im großen Maßstab abzubauen. Diese Eigenschaft wird bisher aber kaum zur

Delignifikation von Biomasse vor einer Hydrolyse der Zuckerpolymere genutzt, wahrscheinlich auch deswegen, weil die Behandlungszeiten relativ lang sein müßten. Der Bewuchs mit delignifizierenden Mikroorganismen wird nur zur Erreichung besserer Verdaubarkeit von lignocellulärem Futtermaterial eingesetzt.

6.3 Hydrolyse

Die Hydrolyse der Polysaccharide Cellulose und Hemicellulose liefert hauptsächlich Glucose- und Xyloselösungen, die dann weiterverarbeitet werden können. Die Hydrolyse kann enzymatisch oder säurekatalysiert durchgeführt werden.

6.3.1 Säurekatalyse

Die Hydrolyse der Cellulose und Hemicellulose sollte, wie bereits erwähnt, getrennt stattfinden, da bei den für die Cellulosespaltung notwendigen Temperaturen die Zucker aus der Hemicellulose bereits wieder abgebaut werden.

Auf die Hemicellulosenhydrolyse mit verdünnter Säure wurde bereits eingegangen. Hemicellulose besteht aus einer leichter und einer schwerer spaltbaren Fraktion. Durch Hydrolyse in einem zweistufigen Reaktorsystem mit einer Stufe mit niedrigerer und einer mit höherer Reaktionstemperatur können daher die Ausbeuten optimiert und der Zuckerabbau minimiert werden.

Bei der Cellulosehydrolyse mit konzentrierter Säure werden zwar aufgrund der milden Reaktionsbedingungen kaum toxische Nebenprodukte gebildet, die benötigten Mengen starker Säure und die Entsorgungs- und Korrosionsprobleme machen einen großtechnischen Einsatz aber unrentabel.

Die Cellulosehydrolyse mit verdünnter Säure wurde zwar schon früh angewandt, verlor in den letzten zwanzig Jahren neben der enzymatischen Hydrolyse aber sehr an Bedeutung, da sie geringere Ausbeuten lieferte und mit toxischen Nebenprodukten und einer aufwendigeren Aufreinigung gerechnet werden muß. Erst neueste Forschungsarbeiten zeigen, daß durch verbesserte Reaktortechniken heute Cellulosehydrolyse bei sehr hohen Temperaturen mit sehr geringen Reaktionszeiten und Säurekonzentrationen möglich ist und so ähnliche Ausbeuten wie mit der enzymatischen Hydrolyse erzielt werden könnten.

6.3.2 Enzymatische Hydrolyse

Für die enzymatische Hydrolyse werden kaum cellulolytische Mikroorganismen direkt eingesetzt, sondern die extrazellulären Cellulasen in eigenen Prozessen hergestellt und dann in reiner Form, die käuflich erworben werden kann, zur Hydrolyse verwendet. Findet die Cellulasenproduktion im selben Betrieb statt, kann auch die rohe Fermentationsbrühe nach Abtrennung der Biomasse eingesetzt werden, was große Kostenersparnisse mit sich bringt.

Die Vorteile einer enzymatischen Hydrolyse liegen in der hohen Ausbeute, den milden Reaktionsbedingungen, dem umweltfreundlichen Prozeß und darin, daß keine toxischen Nebenprodukte gebildet werden, nachteilig sind die langen Reaktionszeiten. Die Aufreinigung der Hydrolysate ist zwar weniger aufwendig und daher günstiger als bei der sauren Hydrolyse, dem stehen aber sehr hohe Kosten für die Enzyme gegenüber. Daher sind Maßnahmen, die den Enzymeinsatz verringern, wie die Rückgewinnung der Enzyme oder der Einsatz von Tween (einer oberflächenaktiven Substanz, die die Cellulaseaktivität erhöht) anzustreben.

6.4 Produkte

Aus den durch die Hydrolyse gewonnen Zuckern Glucose und Xylose können chemisch oder fermentativ weiter Produkte gewonnen werden. Die Forschung auf Basis Maisstroh hat sich hierbei noch nicht mit einer allzu großen Produktpalette beschäftigt.

Besonders interessant ist eine gleichzeitig mit der Hydrolyse erfolgende Fermentation der Zucker, da diese so nicht angereichert werden und daher auch nicht inhibierend wirken können, was die Ausbeute der Hydrolyse steigert.

Ethanol:

Ethanol aus Lignocellulosenhydrolysaten könnte als Treibstoffzusatz eingesetzt werden. Ohne staatliche Förderung, für die im Moment in Österreich geringe Chancen bestehen, ist es derzeit aber trotz intensiver Forschungen noch nicht konkurrenzfähig. Zukünftige Forschungen werden in Richtung gemeinsamer Verwertung von Glucose und Xylose in einem Schritt durch eventuell gentechnisch veränderte Mikroorganismen gehen.

Milchsäure:

Milchsäure ist ein für die Zukunft interessantes Produkt, besonders hinsichtlich der möglichen großen Einsatzgebiete für biologisch abbaubare Kunststoffe aus Polylactat.

Milchsäurebakterien können Pentosen nicht verwerten, eine Abtrennung derselben ist daher notwendig.

2,3-Butandiol:

2,3-Butandiol könnte vor allem als Ausgangsmaterial für Polymere und Butadien dienen. Ein Vorteil dieser Fermentation besteht in der Fähigkeit von einigen 2,3-Butandiol erzeugenden Mikroorganismen sowohl Hexosen als auch Pentosen zu verwerten. Ein bisher ungelöstes großes Problem stellt die Aufarbeitung der Fermentationsbrühe dar, aus der 2,3-Butandiol kaum abgetrennt werden kann.

Xylit:

Xylit könnte als Zuckeraustauschstoff größere Anwendung finden, die fermentativen Umsatzraten für Xylose sind allerdings nicht sehr hoch. Eine nähere Untersuchung des Marktpotentials in Österreich wäre notwendig.

Lignin:

Auch Lignin lässt sich in vielfältiger Weise weiter umsetzen. Es kann zur Energiegewinnung, als Ausgangsstoff für niedermolekulare, besonders auch phenolische Chemikalien, direkt als Spanplattenkleber oder über Lignosulfonsäuren in verschiedensten Produkten wie Bohrmilch oder Harzen genutzt werden.

Abbildung 33 gibt einen Überblick über ein Verwertungskonzept von Maisstroh mit möglichen Reaktionsbedingungen und maximalen, in der Literatur gefundenen, Ausbeuten.

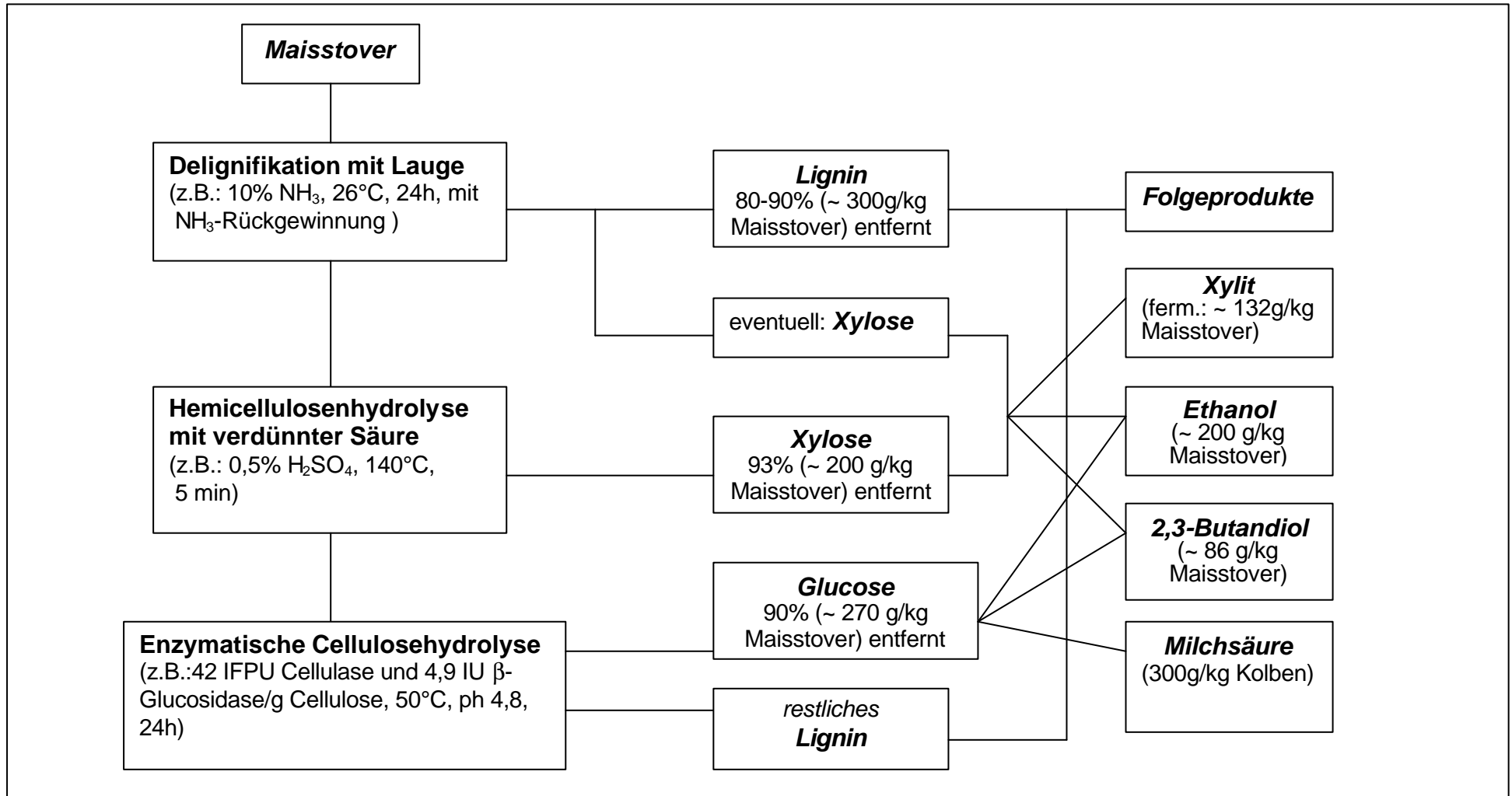


Abb. 33: mögliches Verwertungsschema für Maisernterückstände

6.5 Schlußfolgerung und Aussichten

Für die Verwertung von Maisstroh stehen eine Fülle von Möglichkeiten zur Verfügung. Die Hydrolyse von Maisstroh zu Zuckern und deren weitere Verarbeitung stellt eine Methode dar, welche die ganze Pflanze umfaßt. Für eine wirtschaftliche Nutzung sind aber wahrscheinlich noch weitere Optimierungen der einzelnen Verfahrensschritte und eine Übertragung der derzeit hauptsächlich im Labormaßstab ausgeführten Versuche auf größere Anlagen notwendig. Außer der Optimierung der beschriebenen Prozesse würden Verfahren zur Verringerung der Kosten der Enzyme für die Hydrolyse und bessere Verwertungsmöglichkeiten für Xylose die wirtschaftliche Konkurrenzfähigkeit erhöhen. Letzteres könnte durch gentechnisch veränderte Mikroorganismen oder Wildstämme, die durch ausgedehntes Screening gefunden werden könnten, erreicht werden.

Vorerst werden für die Nutzung der steirischen Maisernterückstände also weniger komplexe und daher wesentlich billigere Verfahren, die auf eine völlige Aufspaltung der Pflanze verzichten (z.B. Produktion von Ölbindemitteln durch Aufmahlung des Kolben), oder Prozesse, die sehr hochwertige Produkte liefern (wie die Produktion von Enzymen), eher in Frage kommen.

Die Forschungsarbeiten in Bezug auf die hydrolytische Verwertung von Maisernterückständen sollten aber dennoch vorangetrieben werden, da aufgrund der Klimaproblematik und einer dadurch notwendig gewordenen nachhaltigen Wirtschaftsweise nachwachsende lignocelluläre Rohstoffe besonders durch ihre CO₂-Neutralität in Zukunft eine größere Bedeutung als Ausgangsmaterialien für die Treibstoff- und chemische Industrie haben werden müssen.

Abkürzungsverzeichnis

AFEX	Ammonia Fiber Explosion
ARP.....	Ammonia Recycled Percolation Process
CCSM.....	Corn Cob Stover Mixture
Da.....	Dalton
E	Enzym
EDA.....	Ethylendiamin
FPU.....	Filter Paper Units
G.....	Glucose
G ₂	Cellobiose
Gew%	Gewichtsprozent
G _x	Cellulose
Gy.....	Gray
IU.....	International Units
IVDMD	In Vitro Dry Matter Digestibility
k.A.....	keine Angabe
K, k.....	Geschwindigkeitskonstanten
M.....	Molar, Mol/L
Mesh	eine Korngrößeneinheit
n-BA	n-Butylamin
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT.....	Raumtemperatur
RZ.....	Reduzierende Zucker
TM.....	Trockenmasse
w/v.....	Masse/Volumen

Literatur

- ¹ Technologische Vorstudie zum Thema „Mais und Mehr“ unter Leitung des Kornberginstituts (7/2001)
- ² Diplomarbeit von Selina Tölderer: *Direkte fermentative Verwertung von Mais-Ernterückständen*, TU-Graz, Institut für Biotechnologie, 2001
- ³ Diplomarbeit von Regina Nievoll: *Mais als nachwachsender Rohstoff*, Karl-Franzens-Universität Graz, Institut für organische Chemie, 2001
- ⁴ Auskunft vom Kornberginstitut für nachhaltige Regionalentwicklung und angewandte Forschung, Haus der Region, Dörfel 2, A-8330 Kornberg, krotschek@feldbach.at
- ⁵ P. Sitte, H. Ziegler, F. Ehrendorfer, A. Bresinsky; *Strasburger-Lehrbuch der Botanik*, 34. Aufl.; Spektr., Akad. Verl., Heidelberg 1999
- ⁶ Franke, Wolfgang, *Nutzpflanzenkunde: nutzbare Gewächse der gemäßigten Breiten, Subtropen und Tropen*, 6. Auflage, 1997, Thieme, Stuttgart
- ⁷ W. Braune, A. Leman, H. Taubert; *Pflanzenanatomisches Praktikum 1*, 7. Auflage; Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart 1994
- ⁸ F. Parisi, *Advances in Lignocellulosics Hydrolysis and in the Utilization of the Hydrolyzates*, *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, 1989, 38, 54-87
- ⁹ Krause, *Polysaccharide*, *Molekular Biologie der Zelle*, 2. Auflage, H. Bielka, Berlin Buch, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1973, 162
- ¹⁰ Wilhelm Nultsch, *Allgemeine Botanik*, 10. Auflage, 1996, Thieme Verlag, Stuttgart
- ¹¹ G.T. Tsao, N. Cao, C.S. Gong, *Hemicellulose Conversion*, *Encyclopedia of Bioprocess Technology*, John Wiley & Sons. Inc., NY, 1999, Vol. 3, 1391-1400
- ¹² R.J. Magee, N. Kosaric, *Bioconversion of Hemicellulosics*, *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, 1985, 32, 62-93
- ¹³ Diplomarbeit Birgit Lassamayer, *Optimierung der Produktion Cellulolytischer Enzyme durch Sclerotium Rolfsii*, Institut für Biotechnologie, TU-Graz, 1993
- ¹⁴ G.J. McDougall, I.M. Morrison, D. Stewart, J.D.B. Weyers, J.R. Hillman, *Plant Fibres: Botany, Chemistry and Processing for Industrial Use*, *Journal Sci Food Agric*, 1993, 62, 1-20
- ¹⁵ C.S. Gong, Ningjun Cao, G.T. Tsao, *Organic Compounds, Cellulose Conversion*, *Encyclopedia of Bioprocess Technology*, John Wiley & Sons. Inc., NY, 1999, Vol. 4, 1895-1905

-
- ¹⁶ Alberts, Bray, *Molecular Biology of the Cell*, 2. Edition, Garland Publishing Inc, New York & London, 1989, 39
- ¹⁷ Purnendu Ghosh, Ajay Singh, *Lignocellulosic Biomass*, Advances in Applied Microbiology, 1993, 39, 295-329
- ¹⁸ L.T. Fan, Young-Hyun Lee, and M.M.Gharpuray, *The Nature of Lignocellulosics and Their Pretreatments for Enzymatic Hydrolysis*, Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology, 1982, 23, 157-187
- ¹⁹ L.T. Fan, Y.H. Lee, D.H. Beardmore, Präsentiert am 2. Int. Symp. über Bioconv. and Biochem. Engineering, Delhi, Indien, März 3-6, 1980
- ²⁰ *Ullmann's Encyclopedia of industrial chemistry*, Volum B2, Unit Operations 1, 1988 VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- ²¹ <http://www.comeau.ca/mills.htm>
- ²² R. Torget, P. Walter, M. Himmel, K. Grohmann, *Dilute-Acid Prereatment of Corn Residues and Short-Rotation Woody Crops*, Applied Biochemistry and Biotechnology, 1991, 28/29, 75-86
- ²³ Prashant V. Iyer, Zhang-Wen Wu, Sung Bae Kim, Yoon Y. Lee, *Ammonia Recycled Percolation Process for Pretreatment of Herbaceous Biomass*, Applied Biochemistry and Biotechnology, 1996, 57/58, 121-132
- ²⁴ C.I. Gil Tortosa, F.J. García Breijo, E. Yúfera, *An Economic Process for Preperation of Xylose and Derivatives by Hydrolysis of Corn Cobs*, Biological Wastes, 1990, 33, 275-286
- ²⁵ Manuel Rubio, Juan F. Tortosa, Joaquin Quesada, Demetrio Gómez, *Fractionation of Lignocellulosics. Solubilization of Corn Stalk Hemicelluloses by Autohydrolysis in Aqueous Medium*, Biomass and Bioenergy, 1998, 15, 6, 483-491
- ²⁶ Mitsuo Tanaka, Campbell W. Robinson, and Murray Moo-Young, *Chemical and Enzymatic Pretreatment of Corn Stover to Produce Soluble Fermentation Products*, Biotechnology and Bioengineering, 1985, 27, 362-368
- ²⁷ William E. Kaar, Mark T. Holtzapple, *Benefits from Tween During Enzymic Hydrolysis of Corn Stover*, Biotechnology and Bioengineering, 1998, 59, 4, 419-427
- ²⁸ Ali. M. Elshafei, J.L. Vega, K.T. Klasson, E.C. Clausen, J.L Gaddy, *The Saccharification of Corn Stover by Cellulase from Penicillium funiculosum*, Bioresource Technology, 1991, 35, 73-80
- ²⁹ William E. Kaar, Mark. T. Holtzapple, *Using lime pretreatment to facilitate the enzymatic hydrolysis of corn stover*, Biomass and Bioenergy, 2000, 18, 189-199

-
- ³⁰ C.R. Wilke, R.D. Yang, A.F. Sciamanna, R.P. Freitas, *Raw Materials Evaluation and Process Development Studies for Conversion of Biomass to Sugars and Ethanol*, Biotechnology and Bioengineering, 1981, 23, 163-183
- ³¹ John D. Taylor, Ernest K. C. Yu, *Continuous steam explosion*, Chemtech, 1995, 38-41
- ³² Chosdu-R Hilmy-N Erizal Erlinda-TB Abbas-B, *Radiation and Chemical Pretreatment of Cellulosic Waste*, Radiation Physics and Chemistry, 1993, 42, 4-6, 695-698
- ³³ G.C. Avgerinos, D.I.C. Wang, *Selective Solvent Delignification for Fermentation Enhancement*, Biotechnology and Bioengineering, 1983, 25, 67-83
- ³⁴ D. G. MacDonald, N. N. Bakhshi, J. F. Mathews, A. Roychowdhury, P. Bajpai, M. Moo-Young, *Alkali Treatment of Corn Stover to Improve Sugar Production by Enzymatic Hydrolysis*, Biotechnology and Bioengineering, 1983, 25, 2067-2076
- ³⁵ A. Singh, A.B. Abidi, A.K: Agrawal, N.S. Darmwal, *Evaluation of Alkali Treatment for Biodegradation of Corn Cobs by Aspergillus niger*, Folia Microbiol., 1989, 34, 479-484
- ³⁶ D. V. Gokhale, S. G. Patil, K. B. Bastawde, *Potential Application of Yeast Cellulase-free Xylanase in Agrowaste Material Treatment to Remove Hemicellulose Fractions*, Bioresource Technology, 1998, 63, 187-191
- ³⁷ Chemical Marketing Reporter. New York: Schnell, 19 August 1996
- ³⁸ Cao, M.S. Krishnan, J.X. Du, C.S. Gong, N.W.Y. Ho, Z.D. Chen, G.T. Tsao, *Ethanol Production from Corn Cob Pretreated by the Ammonia Steeping Process Using Genetically Engineered Yeast*, Biotechnology Letters, 1996, 18, 9, 1013-1018
- ³⁹ Jose M. Domiguez, Ningjun Cao, C.S. Gong, G.T. Tsao, *Dilute Acid Hemicellulose Hydrolysates from Corn Cobs for Xylitol Production by Yeast*, Bioresource Technology, 1997, 61, 85-90
- ⁴⁰ Rodney J. Bothast, Badal C. Saha, *Ethanol Production from Agricultural Biomass Substrates*, Advances in Applied Microbiology, 1997, 44, 261-286
- ⁴¹ Sung Bae Kim, Yoon. Y. Lee, *Fractionation of Herbaceous Biomass by Ammonia-Hydrogen Peroxide Percolation Treatment*, Applied Biochemistry and Biotechnology, 1996, 57/58, 147-156
- ⁴² Daniel J. Schell, Pamela J. Walter, David K. Johnson, *Dilute Sulfuric Acid Pretreatment of Corn Stover at High Solids Concentrations*, Applied Biochemistry and Biotechnology, 1992, 34/35, 659-665
-

-
- ⁴³ John J. Fenske, Andrew Hashimoto, Michael H. Penner, *Relative Fermentability of Lignocellulosic Dilute-Acid Prehydrolysates*, Applied Biochemistry and Biotechnology, 1998, 73, 145-157
- ⁴⁴ Sang-Young Kim, Deok-Kun Oh, Jung-Hoe Kim, *Evaluation of xylitol production from corn cob hemicellulose hydrolysate by Candida parapsilosis*, Biotechnology Letters, 1999, 21, 891-895
- ⁴⁵ A. Esteghlalian, A.G. Hashimoto, J.F. Fenske, M.H. Penner, *Modeling and Optimization of the Dilute-Sulfuric-Acid Pretreatment of Corn Stover, Poplar and Switchgrass*, Bioresource Technology, 1997, 59, 129-136
- ⁴⁶ Nurdan Eken-Saracoglu, S. Ferda Mutlu, Günes Dilmac, Hande Cavusoglu, *A Comparative Kinetic Study of Acidic Hemicellulose Hydrolysis in Corn Cob and Sunflower Seed Hull*, Bioresource Technology, 1998, 65, 29-33
- ⁴⁷ Sarad R. Parekh, Rannade S. Parekh, Morris Wayman, *Ethanol and butanol production by fermentation of enzymatically saccharified SO₂-prehydrolysed lignocellulosics*, Enzyme Microb. Technol., 1988, 10, 660-668
- ⁴⁸ T.J. Hamilton, B.E. Dale, M.R. Ladisch, G.T. Tsao, *Effect of Ferric Tartrate/Sodium Hydroxide Solvent Pretreatment on Enzyme Hydrolysis of Cellulose in Corn Residue*, Biotechnology and Bioengineering, 1984, 26, 781-787
- ⁴⁹ S. Rodríguez, R. Santoro, C. Camselle, A. Sanromán, *Effect of different parts of the corn cob employed as a carrier on lignolytic activity in solid state cultures by P. chrysosporium*, Bioprocess Engineering, 1998, 18, 251-255
- ⁵⁰ H. Janshekar, A. Fiechter, *Lignin: biosynthesis, application and biodegradation*, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 1988, 27, 119-173
- ⁵¹ K. Karunandaa, S.L. Fales, G.A. Varga, D.J. Royse, *Chemical Composition and Biodegradability of Crop Residue Colonized by White-Rot Fungi*, J Sci Food Agric, 1992, 60, 105-112
- ⁵² M. Linko, *An Evaluation of Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Materials*, Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology, 1977, 5, 27-48
- ⁵³ Y.Y. Lee, Prashant Iyer, R.W. Torget, *Dilute-Acid, Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass*, Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology, 1999, 65, 93-115
- ⁵⁴ K. Belkacemi, N. Abatzoglou, R.P. Overend, E. Chornet, *Phenomenological Kinetics of Complex Systems: Mechanistic Considerations in the Solubilization of Hemicelluloses following Aqueous/ Steam Treatments*, Ind. Eng. Chem. Res., 1991, 30, 11, 2416-2425
- ⁵⁵ E. Primo-Yúfera, C.I. Gil-Tortosa, F.J. García-Breijo, *Hydrolysis of Corn-Cob Lignocellulosic Residue from Pentose Preparation*, Bioresource Technology, 1995, 52, 1-4

-
- ⁵⁶ Nandan Bhandari, Douglas G. Macdonald, Narendra N. Bakhshi, *Kinetic Studies of Corn Stover Saccharification Using Sulphuric Acid*, *Biotechnology and Bioengineering*, 1984, 26, 320-327
- ⁵⁷ J.J. McParland, H.E. Grethlein, A.O. Converse, *Kinetics of Acid Hydrolysis of Corn Stover*, *Solar Energy*, 1982, 28, 1, 55-63
- ⁵⁸ Thomas W. Jeffries, *Utilization of Xylose by Bacteria, Yeasts, and Fungi*, *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, 1983, 27, 1-29
- ⁵⁹ Rongfu Chen, Y.Y. Lee, Robert Torget, *Kinetic and Modeling Investigation on Two-Stage Reverse-Flow Reactor as Applied to Dilute-Acid Pretreatment of Agricultural Residues*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1996, 57/58, 133-146
- ⁶⁰ Rongfu Chen, Zhangwen Wu, Y.Y. Lee, *Shrinking-Bed Model for Percolation Process Applied to Dilute-Acid Pretreatment/Hydrolysis of Cellulosic Biomass*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1998, 70-72, 37-49
- ⁶¹ Eleonora Winkelhausen, Slobodanka Kuzmanova, *Review: Microbial Conversion of D-Xlose to Xylitol*, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1998, 86, 1, 1-14
- ⁶² Nathan S. Moiser, Philip Hall, Christine M. Ladisch Michael R. Ladisch, *Reaction Kinetics, Molecular Action, and Mechanisms of Cellulolytic Proteins*, *Advances in Biochemical Engineering*, 65, 23-40
- ⁶⁴ Alexander V. Gusakov, Arkady P. Sinitsyn, Anatole A. Klyosov, *A Theoretical Comparison of the Reactors for the Enzymatic Hydrolysis of Cellulose*, *Biotechnology and Bioengineering*, 1987, 29, 898-900
- ⁶⁵ J. Falbe, M. Regitz, *CD Römpp Chemie Lexikon*, 9. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- ⁶⁶ A. Pühler, M. Regitz, D. Schmid, *Römpp Kompakt, Lexikon Biochemie und Mikrobiologie*, 2000, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, NY, 2000
- ⁶⁷ *Commodity Chemicals and Energyproduction*, *Commercial Biotechnology: An international Analysis*, Office of Technology Assessment, Congress of the U.S., Pergamen Press, S 245
- ⁶⁸ H. Pellweg, R.D. Schmid, W.E. Trommer, *Römpp Lexikon Biotechnologie*, 1992
- ⁶⁹ H. Danner, B. Molzbichler, G. Notegger, R. Braun, *Biotechnologie zur Produktion von marktrelevanten Chemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen-Studie* im Auftrag des Bundesministeriums für wirtschaftliche Angelegenheiten, Auftragnehmer: IFA-Tulln, Dezember 1998
- ⁷⁰ Aus Folien von Dr. Steinmüller zur Eröffnung des Mais und Mehr Projekts, 2000
-